

**SOLUBLE PEPTIDE ANALOGUES CONTAINING BINDING SITES****Publication number:** JP5507197 (T)**Publication date:** 1993-10-21**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:**

- international: A61K38/00; A61K39/395; A61P25/00; A61P29/00; A61P37/00; A61P43/00; A61P7/02; C07K14/00; C07K14/705; C07K16/00; C07K16/18; C07K19/00; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/02; C12P21/08; C12R1/91; A61K38/00; A61K39/395; A61P25/00; A61P29/00; A61P37/00; A61P43/00; A61P7/00; C07K14/00; C07K14/435; C07K16/00; C07K16/18; C07K19/00; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/02; C12P21/08; (IPC1-7): A61K37/02; A61K39/395; C07K15/12; C12N15/13; C12N15/62; C12N15/85; C12N5/10; C12P21/02; C12P21/02; C12P21/08; C12R1/91

- European: C07K14/705; C07K16/18

**Application number:** JP19910509369T 19910425**Priority number(s):** WO1991US02852 19910425; US19900513299 19900425**Also published as:**

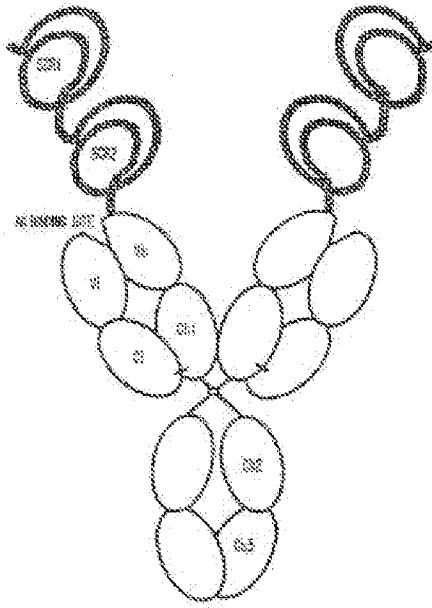
- WO9116437 (A1)
- US6458360 (B1)
- EP0528926 (A1)
- EP0528926 (B1)
- CA2081207 (A1)
- AU7876691 (A)
- AT168415 (T)

&lt;&lt; less

Abstract not available for JP 5507197 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9116437 (A1)**

This invention is directed to a soluble recombinant fused protein which is stable in the mammalian circulatory system comprising a polypeptide which contains a recognition site for a target molecule, such as a complement receptor site, and is joined to the N-terminal end of an immunoglobulin chain. The invention is also directed to a construct comprising a plurality of peptides containing short consensus repeats having a complement binding site attached to a soluble, physiologically compatible, macromolecular carrier. The invention is particularly useful for inhibiting complement activation or complement-dependent cellular activation in mammals.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

CR /

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平5-507197

⑬ 公表 平成5年(1993)10月21日

⑭ Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 P 21/02

識別記号  
ZNA C

序内整理番号  
8214-4B  
8931-4B  
7236-4B

審査請求未請求  
予備審査請求有  
C 12 N 15/00  
5/00

部門(区分)  
1 (1)  
A  
B※

(全 18 頁)

⑮ 発明の名称 結合部位を含む可溶性ペプチド類縁体

⑯ 特 願 平3-509369

⑰ 出 願 平3(1991)4月25日

⑮ 翻訳文提出日 平4(1992)10月26日

⑯ 国際出願 PCT/US91/02852

⑰ 國際公開番号 WO91/16437

⑱ 國際公開日 平3(1991)10月31日

⑲ 优先権主張 ⑲ 1990年4月25日 @米国(US)⑲ 513,299

⑲ 発明者 フエアロン, ダグラス・ティー アメリカ合衆国メリーランド州21210, パルティモア, ブライスウッド・ロード 3

⑲ 出願人 ザ・ジョーンズ・ホブキンス・ユニバーシティ アメリカ合衆国メリーランド州21205, パルティモア, ラットランF・アベニュー 720

⑲ 代理人 弁理士 湯浅 基三 外6名

⑲ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E, D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許), U S

最終頁に続く

#### 請求の範囲

1. 哺乳動物の免疫系において安定で、徴的分子に対する認識部位を含み免疫グロブリン類のN末端に置かれたポリペプチドからなる、可溶性組み換え融合タンパク質。

2. 少なくとも1つの頭が請求項1記載の可溶性組み換え融合タンパク質である抗体分子からなるタンパク質。

3. 上記ポリペプチドが結合部位またはウイルス結合部位の配列に相当する配列を含む、請求項1記載のタンパク質。

4. 上記ポリペプチドが1つまたは複数の短い共通繰り返し配列を含んでいる、請求項1記載のタンパク質。

5. 上記抗体分子が、軽鎖または重鎖の一方がCR1のC4b結合部位を含む結合部位を含み、他方がCR1のC3b結合部位を含む認識部位を含むようならぬものである、請求項2記載のタンパク質。

6. 上記抗体分子がCR1のC4b結合部位とCR1のC3b結合部位の両方を含む當該からなる請求項2記載のタンパク質。

7. CR2の結合部位、CR1のウイルス結合部位、およびSCR1からSCR2までを含むCR2の結合部位からなるグループから選択される結合部位を含む、請求項3記載のタンパク質。

8. CR1の結合部位、SCR8からSCR11までを含むCR1の結合部位から選択される結合部位を含むCR1の結合部位、およびC4b結合部位を含むCR1の結合部位からなるグループから選択される結合部位を含む、請求項3記載のタンパク質。

9. リードペプチドをコードするDNA配列と免疫グロブリン類のN末端をコードするDNA配列との間に、徴的分子に対する認識部位を含むポリペプチドをコードするDNA配列を挿入することにより、免疫グロブリン類用の免疫ベクターを改変することを含む、請求項1-8記載のタンパク質をコードする発現ベクターの生産法。

10. 請求項1-8記載のタンパク質をコードするDNA配列を含む発現ベクター。

11. 上記タンパク質を発現する請求項10記載のベクターをもつ細胞。

12. 免疫グロブリン類のN末端に置かれたポリペプチド(該ポリペプチドは徴的分子の認識部位を含む)が少なくとも一方の頭に含まれる抗体分子もしくはプラグメントからなるタンパク質を分認する、請求項11記載の細胞。

13. 請求項11または12記載の細胞を培養してタンパク質を回収することからなる、該タンパク質の生産方法。

14. 編接結合部位またはウイルス結合部位を含む認識部位を少なくとも1つ持つペプチドを含み、そして更に生理学的に適合可能な可溶性抗体巨大分子を更に含む可溶性抗体物(コンストラクト)。

15. 上記ペプチドが短い共通繰り返し配列を含み、請求項14記載の可溶性コンストラクト。

16. 抗体巨大分子が免疫グロブリン類または抗体分子である、請求項14または15記載の可溶性コンストラクト。

17. 上記ペプチドがCR1の結合部位およびCR2の結合部位を含む、請求項14記載の可溶性コンストラクト。

18. CR2の結合部位、CR1のウイルス結合部位、およびSCR1の初めから終りまでを含むCR2の結合部位からなるグループから選択される結合部位を含む、請求項14記載の可溶性コンストラクト。

19. CR1の結合部位、SCR8からSCR11までを含むCR1の結合部位から選択される結合部位を含むCR1の結合部位からなるグループから選択される結合部位を含む、請求項14記載の可溶性コンストラクト。

20. 請求項1-8記載のタンパク質または請求項14-19記載の可溶性コンストラクトを哺乳動物へ投与することからなる、該哺乳動物における抗体依存性の細胞活性化を阻止する方法。

21. 請求項14-19記載の可溶性コンストラクトまたは請求項1-8記載のタンパク質を、製薬上許容し得るペール中に含む治療用組成物。

22. 病原または免疫器官を持った患者に請求項21記載の治療用組成物を投与することによる、該患者の治療方法。

特表平5-507197 (2)

23. 上記タンパク質がCR2の結合部位またはCR2のケイルス結合部位を含み、上記疾患または免疫障害が、不適合なBリンパ球活性化障害、自己抗体／免疫複合体関連疾患、エブシュタイン・バーレウイルス関連疾病、および免疫活性化に対する不適合な抗体反応が個々の免疫抑制障害からなるグループから選択される。請求項22記載の方法。

24. 上記タンパク質がCR1の結合部位を含み、上記疾患または免疫障害が、血栓性状態、重症筋無力症、望ましくないまたは不適合な結合活性化が個々の免疫反応、炎症による障害、免疫複合体関連疾病、および神経学的障害からなるグループから選択される。請求項22記載の方法。

明細書

結合部位を含む可溶性ペプチド類似体

本発明は、国立衛生研究所助成会員号A122833及びA128191により提供された援助を受けたものである。合衆国政府は、本発明に対し、一定の権利を有している。

発明の分野

本発明は、標的分子に対する認識部位を含む、可溶性組換え融合タンパク質を目的とするものである。

従来の技術

哺乳類の血液系には、正確な組成成分はそれらの濃度同様に時々変化するものの、多様にわたる異なる分子が存在している。血清組成のこの変化は対応のスペクトルに応答したものであり、血清組成及び濃度の変化を感知することによって、哺乳類の様々な器官は刺激に反応することができる。生物体の細胞は、細胞表面の変化を、血清の様々な組成分子に結合する細胞表面レセプターを用いて認識する。血液系のこれら特定組成成分の、細胞表面レセプターへの結合に影響を及ぼすことで、生物の細胞が刺激へ反応する仕方に変化をもたらすことが可能である。

構造システム

現状技術に応答して変化し、細胞表面レセプターへの結合によってその変化が感知される血清組成システムの一例は、補体システムである。補体システムは、例えば微生物のような外来要素を認識するための機構であり、2つの段階を進行する：第一段階は、C3及びC4という二つの補体タンパク質が、補体活性化複合体の一端であるタンパク質及び炭水化物へ共有結合することである。取扱い液に応じて、2つの別個の系統のうちの一つが、C3を切断するC3コンバーゼ（活性酵素）と呼ばれる酵素を活性化して、C3のアルファボリペプチドよりC3αペプチドを放出させ、C3β断片に主要な立体構造変化を引き起こす。

第二段階は、リンパ球及び巨核細胞といった様々な細胞種による、レセプターを媒介とする複合体への結合である。補体による認識の第二段階では、C3及びC

4の共有結合した断片を含む複合体が、これらの断片に特異的なレセプターを持つ細胞に結合される。これらのレセプターは補体レセプター、タイプ1 (CR1, CD35)、タイプ2 (CR2, CD21)、及びタイプ3 (CR3, CD11b/18)と名付けられている。レセプターは、免疫及び炎症反応に関与する様々な細胞種の表面に見い出されている。微生物及びその生産物質に対する免疫及びリソバ球の反応を調節することによって、C3の活性化が代替系路を通じて起こる場合、この補体システムの認識プログラムが宿主が抵抗するための主要な役割を行う。外来分子に対する抗体により通常の系路が活性化された場合には、補体断片の結合は増強の役割を担う。

補体レセプター タイプ1のSCRモチーフ

CR1は既に広範にわって研究されており、ショート コンセンサス リピート (SCR) と名付けられている60-70アミノ酸の構造モチーフが発見されている。SCRモチーフは、CR1のアーロナイト中では30回 tandemで繰り返されており、他のアーロナイト中ではさらに何回か繰り返しがある。SCRの共通配列は全てのSCRで不变である4つのシテイン、1つのグリシン及び1つのトリプトファンを含んでいる。他の30個のSCRの半分以上において、更に16残基が同じアミノ酸あるいは他のアミノ酸に保存的に置換されていた形で保存されている (Klickstein, et al. (1987), *J. Exp. Med.*, 165:1095-1112, 及び *J. Exp. Med.*, 169:1699-1717; Bourcet, et al. (1988) *J. Exp. Med.*, 168:1253-1270)。各SCRの大きさはおよそ2.5~3.0nm × 2nm × 2nmと見積もられている。

SCR (同じ不変残基を持ち、シティン間の距離が類似しているもの) のタンデムリピートは、補体システムが一つの、さらには12種のタンパク質中で固定されている (Hearn, et al. (1989), *Adv. Immunol.*, 46:183-219)。これらのタンパク質は、C3、C4、またはC5、(すなわち、代替または通常系路のC3-C5コンバーゼや脱取型複合体のサブユニットである相同な補体タンパク質群) と相互作用する能力をそれぞれ分担している。SCRを含む補体タンパク質は、活性化機能 (C1r, C1s, ファクターB及びC2) を持つ

いたり、血相沈殿またはリンパ球の凝集を引き出すことができる細胞レセプターとして働いたり (CR1及びCR2)、あるいは補体チャネル型免疫活性化複合体の形成を促進している (C6及びC7) と予想される。既に、SCRは補体システムの最も特異的な構造の一つである。インターリキシング-2レセプターアルファ鎖、ベータ-2-グリコプロテイン (glycoprotein) I及びファクター-XIIIのような補体タンパク質以外のものにもSCRが存在していることが、必ずしもこれらのタンパク質が補体に固与する役割を持つことを示すとは限らないが、しかし、その可能性は否定されていない。

CR1のN末端から既知で28番目までのSCRは、4つの一続きのグループに分けることができ、それぞれ7個のSCRを含み、ロング相同期リピート (LHR) と呼ばれ、A, B, C, 及びDで示される。LHR-Aに続いて、残り2つのSCR、そのうしろにCR1を細胞表面にとどめる役目を持つ25アミノ酸の脱取型領域と4-3アミノ酸の細胞質領域が重なっている。3箇所の補体結合部位はCR1中の以下に位置している：1箇所はC4bに特異的なLHR-A、もう2箇所はC3bに特異的なLHR-B及びLHR-C内 (Klickstein, et al., 1988, 上記)。各LHRのN末端から2つのSCRが、リガンド特異性に関与している。補体活性化物質はその表面に複数のC4b及びC3b分子を結合すると予測されるため、この多価CR1は、一般的のレセプターに比して、それらの分子となり効果的に相互作用することが可能である。

その他の中性粒細胞レセプター

補体レセプター タイプ2 (CR2, CD21) は、15あるいは16のSCRでできた細胞外領域、24アミノ酸の脱取型領域及び34アミノ酸の細胞質領域から成る膜貫通型リン酸化タンパク質である (Moore, et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9194-9198; Weiss, et al. (1988), *J. Exp. Med.*, 167:1047-1066。本明細書の参考文献に含まれる)。可溶性粗画えCR2を電子顕微鏡で研究した結果、CR1同様、CR2は、計算上長さ3.9、6ナノメーターX3.2ナノメーターの外部を持つ、長い、非常に柔軟性に富む分子であり、そのなかにSCRは2.4ナノメーターの長さの小窓として見えることが示された (Moore, et al. (1989), *J. Biol. Chem.*, 264:20576-20582)。

特表平5-507197 (3)

CR2はエピステイニア・ウィルス (EBV) の  $\epsilon p 350/220$  エンゲッチャントンパク及び補体C3d $\epsilon$ タンパク前片双方に対するB細胞レセプターである (Akbari, et al., 1989, 上記)。抗CR2モノクローナル抗体 (OK B7) は、C3d $\epsilon$ 及びEBV双方の結合を阻害し、天然及びウィルス性のリガンドがレセプター上の二つの同じあるいは近接の部位に結合することを示唆している (Meyerom, et al., 1985), *J. Virol.*, 55:347-351)。CR2の欠失あるいは遺伝型異常を、COS細胞中で発現する真核生物発現ベクターを用いた組換えDNA実験によって、CR2のリガンド結合部位が分子のN末端側の二つのSCRに位置付けられた (Lowell, et al., 1989), *J. Exp. Med.*, 170:1931-1946)。細胞結合型CR2によりIC3b及びC3d $\epsilon$ のような多様型C3リガンドが結合することが、B細胞の活性化を引き起す (Melchers, et al., 1985), *Nature*, 317:264-267; Bohnsack, et al., (1988), *J. Immunol.*, 141:559-565; Carter, et al., (1988) *J. Immunol.*, 141:457-463及び Carter, et al., (1989), *J. Immunol.*, 143:1755-1760)。

第三の補体レセプターCR3もまた、IC3bを結合する。CR3へのIC3bの結合が、炎症中に補体活性化された内皮細胞への好中性白血球の付着を促進する。CR3もまた作用に関与し、その作用では、IC3bに接觸された粒子が好中性白血球あるいはマクロファージに飲み込まれる (Wright, et al., 1982), *J. Exp. Med.*, 155:1149; (1983) *J. Exp. Med.*, 158:1338)。

#### 可溶性補体レセプター

CR1は補体活性化を効率的に阻害するための候補である。CR1のみが、C3b及びC4bへの特異性に加えて、複数のC3コンバーチャーの解離能力、及びファクターIによってC3b及びC4bをタンパク分析して不活化する時の共同因子活性能を合わせ持っている。さらに、恐らく決定的に重要なこととして、CR1のこれらの機能が代替経路によって制限されないことが挙げられ、このため非免疫的刺激による活性の抑制に適したレセプターとなっている。

可溶性CR1 (sCR1) 断片を、膜貫通及び細胞質領域が欠失したcDNAを用いて、組換えDNA技術により作製した (Pearson, et al., 国際特許出願WO 89/09220号、1989年10月5日公開、Heissman, et al.,

性質を持たないようである (Meyerom, et al., 1990), *J. Virol.*, 64:1348-1352)。可溶性レセプターは免疫系とはならないため、効果を上げるためにアジュバントを使用する必要がなく、さらにはまた、効能は完全な免疫系があるかどうかには依存しないと予想される。

CR2はエピステイニア・ウィルスに対する抗体の初期決定因子の一つであるが、それは細胞質にウィルス粒子を特異的に結合するためである。レセプターの細胞外領域は完全に含むが、膜貫通および細胞質領域を持たない発現ベクターにより、組換えシステム内で可溶性CR2を作製した。この組換えCR2は、エピステイニア・ウィルスと1:1の割合、Kd=3, 2nMで結合すると報告されている (Moore, et al., 1989), *J. Biol. Chem.*, 264:20576-20582)。

ウィルスに対する可溶性型の既結合型レセプターランパクを投与することによってウィルスの結合を阻止するという試みは、他のウィルス系、特にAIDSで研究されてきた。AIDSウィルス レセプター タンパクCD4は、細胞外領域はコードするが膜貫通及び細胞質領域はコードしないDNAを用いて、組換え方法により、可溶性型で作製された (Hussey, et al., 1988), *Nature*, 331:7-8)。この組換えタンパクは培養細胞のAIDS感染を阻止することに成功したが、しかし、患者に注射した場合、薬剤除去の大半の段階である約一時間ほどで、組換えタンパクは急速に取り除かれてしまった (Kabak, et al., 1990), *Ann. Intern. Med.*, 112:254-261)。

#### ハイブリッド免疫グロブリンタンパク

可溶性CD4の半減期の短さを克服するため、ネズミの免疫グロブリン分子の可溶性領域をコードするDNAをCD4の結合領域をコードするDNAに置き換えた組換えDNA技術により、ハイブリッド分子を作製した (Capon, et al., 1989), *Nature*, 337:525-531及び国際特許WO 89/09222)。このことは、CD4がそれ自体免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの一員であり、從って、置換された可溶性領域に類似した構造を持っているために可能である。ネズミ免疫グロブリンを骨格とするCD4ハイブリッドは、可溶性CD4と比較して、カサギにおいて血清中の半減期がかなりの増加を示した。

*Clin. Res.*, 38:287A, 1990)。Pearsonらが同時に記載したベクターpBSCR1cから生産して精製したsCR1タンパク (以後、本明細書ではsCR1/pBSCR1cと呼ぶ) は、二量体<sup>125</sup>I-C3b及び<sup>125</sup>I-C4bにKds (平衡解離定数) 1nM及び1.2nMで結合し、ファクターによるこれらのタンパク質の切断を媒介し、さらにナノモルの濃度でヒト血清中の通常及び代替経路を阻害したことから、リガンド結合部位は完全であり、強力な試験管内阻害機能を持つことが示された (Heissman, et al., 1990, 上記)。

sCR1/pBSCR1cの生体内での補体阻害機能をラットをモデルに研究した (Heissman, et al., 1990, 上記)。sCR1/pBSCR1cは、補体活性化を阻害し、局所炎症によって誘導した心筋内での好中性白血球の蓄積の減少により実証されたように、炎症を低下し、さらに組織の傷害を小さくした。組換え sCR1/pBSCR1cは、局部贫血に引き続く炎症において、組織の受ける損傷を認め、従って、免疫複合体による管炎、糸球体腎炎、溶血性貧血、重度の筋力不足、奇形性膀胱炎及び多発性硬化症のような、補体依存性病態があるとわかっている、より複雑な自己免疫疾患に対する応用にとって好ましいものである。

可溶性CR2類縁体の作製が試みられた (Moore, et al., 1989), *J. Biol. Chem.*, 264:20576-20582)。可溶性CR1のシステムに依って、レセプターの細胞外領域は完全に含むが、膜貫通および細胞質領域は持たない発現ベクターより、組換えシステム内で可溶性CR2を作製した。この組換えCR2はC3d $\epsilon$ と1:1の割合、Kd=7, 5ミクログルモルで結合した。しかしながら、C3d $\epsilon$ に対する結合親和性が低すぎるため、いかなる治療への応用も到底不可能である。

#### 抗ウイルス薬としての可溶性レセプター

急性のウィルス感染を阻止するために可溶性のウイルスレセプターを用いることは、数多くの利点がある。様々なウイルス病原体も同一の細胞レセプターを認識しなければならないため、ウイルスのエンベロープタンパクあるいは類の変型によって生じる抗原の変化や多型という問題を回避できると思われる。さらに、細胞レセプターのウイルス結合領域は、抗原性、毒性または免疫抑制的な

Bruggemannら (1987), *J. Exp. Med.*, 166:1351-1360) もまたハイブリッド抗体を作製して、抗原結合部位を不变の状態で保っている抗体の機能に対して、分子を作製して、抗原結合部位を不变の状態で保っている抗体の機能に対して、分子の様々な部分における変化が及ぼす影響を研究した。この研究でもまた、免疫グロブリン分子に挿入したペプチド配列は、それによって置換されたペプチドのものと類似していた。この研究によって、免疫グロブリン構造の領域は、分子全の構造を模倣するに、類似した構造によって置換できることが示された。

生化学的研究に用いるのに十分なT細胞レセプターランパクを得るために、G-scioigneら (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:2936-2940) T細胞レセプターと免疫グロブリンのハイブリッドタンパクをコードする発現ベクターを開発した。T細胞レセプターは免疫グロブリンスーパーファミリーの一員であり構築した。レセプターランパクを系統的にコードする配列を形づくるように再構成する、いくつかの類似の遺伝子部分からなるゲノムDNAにコードされている。最終的に再構成された配列は、免疫グロブリン同様に、可変、多様及び連続領域を持つ。ハイブリッドレセプターランパクは、免疫グロブリン重鎖の発現ベクターの可変領域をT細胞レセプターの可変領域で置換して構築された。そして、このベクターを、既存のものを分離している細胞で発現させた。形質転換した細胞系は、免疫グロブリンとT細胞レセプター双方の決定因子を持つキメラランパクを分泌した。

上記の先の技術では、免疫グロブリンスーパーファミリー (Boddy, et al., 1987), *Cell*, 51:225-229) 由来の免疫グロブリンペプチドとの相同性を持った、既存のユニットを有するペプチド領域をコードするDNA配列のみで置換した。既存のユニットを有するペプチド領域をコードするDNA配列のみで置換した。免疫グロブリンの相同ユニットに対応するDNA配列は、宿主細胞のハイブリッドタンパクを発現する能力を損なうことなく、除去、及び免疫グロブリンスーパーファミリーに属する他のタンパク質由来の、類似相同ユニットをコードするDNAにより置換された。

発明の要旨

本発明の一つの目的は、特異的に特異的に結合可能な可溶性タンパク質で、哺乳類起源からの除去半減期が長い該タンパク質を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、特異的に特異的に結合可能な可溶性タンパク質

## 特表平5-507197 (4)

で、他の分子に対してより高い親和性を持つ複数タンパク質を提供することである。

本発明のさらなる目的は、複数タンパク質に対して特異的に多様に結合することのできる可溶性の構造物を提供することである。

本発明のまたもう一つの目的は、血管内から組織へよりよく拡散するであろう小型の構造物を持つ可溶性の構造物を提供することである。

本発明のさらにもう一つの目的は、細胞膜結合型のレセプターと結合し、哺乳類の宿主系に保持されると予想される可溶性の構造物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、宿主系に安定に存在する可溶性の構造物を投与して、動物内の操作によっておこる細胞活性化を阻害する方法を提供することである。

本発明のさらにもう一つの目的は、宿主系に存在する可溶性の構造物を投与することによって、動物内の複数活性化を阻害する方法を提供することである。その一面として、本発明は、哺乳類の宿主系に安定であり、他の分子認識部位を含みかつ免疫グロブリン鎖のN末端の頭に連結されたポリペプチドから成る、可溶性組換え融合タンパク質について考える。治療にその組換え融合タンパク質を使用することもまた想定されている。

前述した一面として、本発明は、発現ベクター、並びに、リーダーペプチドをコードするDNA配列と免疫グロブリン鎖のN末端の頭をコードするDNA配列の間に、結合あるいは認識部位をコードするDNA配列を挿入することによって、免疫グロブリン鎖の発現ベクターを改変することからなる組換え融合タンパク質発現ベクターの作製方法について考える。ベクターを含む宿主細胞についても、免疫グロブリン鎖を好みやすく発現するような細胞を考慮して、少なくとも一つの免疫グロブリン鎖のN末端に、組合した結合あるいは認識部位を持つ、完全な免疫グロブリン分子あるいはフラグメントが分泌されるようとする。

本発明のこの面の組換え融合タンパク質は、免疫グロブリン分子の安定性及び可溶性によって、可溶性で、水生の培養液、特に哺乳類宿主系で比較的の安定であると予想される。組換え融合タンパク質が抗体分子の一部として分泌される場合、該分子は、4個の免疫グロブリン鎖のうちの少なくとも2個のN末端の頭についたポリペプチド認識部分を持ち、さらにまた、多様性を与える他の分子に対し

てより高い親和性を示す。免疫グロブリン構造に由来する疏水性、特に抗体分子のヒンジ(つぶれ)によるものであるが、これが、ポリペプチド結合部位の動きが、そのほかの部分に比べて、他の分子上の相補部位の三次元的配置への結合部位の三次元的配置の適応を容易にすることを可能にしている。

一方、複数結合部位をもつ多数のショートコンセンサスリピートを含む組換え融合免疫グロブリンタンパクの利用は、本発明の好ましい結果であるが、本発明はまた、より広範に、可溶性で生理学的に適合可能な抗体に連結した複数結合部位を持つショートコンセンサスリピートを含む複数のペプチドから成る構造物や、このような構造物の治療への利用についても考慮する。

このような構造物は、複数の結合部位を呈示すること(多面)によって結合の親和性を高めることで、重要な利点を提供する。本発明の構造物が示す高い親和性は、この構造物を治療に利用する上で、重要な利点を提供する。成熟CR2は低親和性の結合部位を一つしか含まないため、このような利点は、特にCR2由來のショートオリーブードを用いる治療にとって重要である。

### 試験の実験的説明

第1回 CR2-1gG1融合タンパク発現用に構築されたプラスミドの地図。  
CR2：複数レセプター タイプ2： VH：可変領域； ガンマ1：不変領域； CH1-3：不变重鎖コード領域； NEO：G418耐性コード遺伝子； SV40：強力ウイルス40プロモーター。

第2回 CR2-1gG1用プラスミド構築時の、ガンマ-1ゲノムDNAに導入したDNA配列の改変の詳細。

第3回 完全なCR2-1gG1の概念モデル。SCR1, 2: CR2分子のショートコンセンサスリピート； VH, CH1, H2, H3: 重鎖の可変及び不变領域； VI, C1: ラムダ軽鎖の可変及び不变領域。

第4回 \*\*\* I-型添付C3dのK562細胞上のCR2への結合のCR2-1gG1による阻害。

第5回 3日生存率モル量の非標識結合物質存在下または非存在下における、\*\*\* I-型添付CR2-1gG1のB95/8細胞への結合。

第6回 CR2-1gG1による末梢血Bリンパ球のE B V感染の阻害。

第7回、マウスをCR2-1gG1で処理した場合のフルオレセイン特異的IgMレベルの低下。

第8回 CR2-1gG1による、フルオレセイン-フィヨールによって生じた、フルオレセイン特異的ブラーク形成細胞数の減少。

第9回 pSNRCR2及びpSNR021<sup>+</sup>プラスミドをそれぞれ安定に発現するJ558L細胞から分離された、精製組換えCR2-1gG1(左レーン)及びIgG1(右レーン)のSDS-ポリアクリラリアルミドゲル。

第10回、ヒトまたはネズミのC3断片を担うチモサン粒子に対する[\*\*\*]I-pCR2-1gG1の結合。(A) Ca<sup>++</sup>及びMg<sup>++</sup>が存在して代謝系の活性化がおこりうる条件下(白四角)、あるいはEDTAを加えてその活性化を阻害した条件下(黒四角)で、ヒト血清と反応させておいたL<sub>3</sub>×10<sup>6</sup>のチモサン粒子に[\*\*\*]I-pCR2-1gG1を段階的に増加した様な浓度で加えて、30分、0℃でアシキュベートした。10%BSAにて粒子を遠心して上清を除き、結合したリガンドと解離しているリガンドを分離した。粒子に付着したC3断片に対する[\*\*\*]I-pCR2-1gG1の特異的結合(白丸)は、それぞれ、陽イオン存在あるいは非存在下の血清と反応させておいた粒子への結合量の差として算出した。日付は二回測定したという意味を示している。(B) [\*\*\*]I-pCR2-1gG1の、二価陽イオン存在下(白四角)またはEDTA存在下(黒四角)で、ネズミ血清と反応させておいたチモサン粒子に対する結合能も同様に調べ、特異的結合(白丸)を(A)で述べた実験と同様に算出した。

第11回、ヒツジ赤血球(E)で免疫したマウスにおける、CR2-1gG1とコプラ毒因子(CVF)の免疫抑制効果の比較。6から8週齢のBALB/cマウスメス8匹を含む1グループから、4×10<sup>7</sup>または4×10<sup>8</sup>のヒツジEで静脈内免疫する24時間の内にCVF(マイツ、ゲッテンゲンのO. Gaize博士より供与していただいた)5ミクログラムを4回投与する方法によつてC3を除去した。2グループのマウスには、純度8000ミクログラムのCR2-1gG1またはIgG1を、4日に分けて、免疫後24時間以内に、静脈注射して投与した。4番目のグループのマウスにはPBSのみを投与し、免疫を行わなかった。5日に、脾臓の抗ヒツジEブラーク形成細胞数をアセシスし、さらに5番

の同型での特異的抗ヒツジE抗体の血清濃度をELISAで測定した。データは各決定に用いられたマウス4匹の平均値±標準偏差(SEM)で示す。

第12回 BALB/c及びC3H/HetJマウスにおけるヒツジEに対する抗体反応のCR2-1gG1による抑制の結果。BALB/c及びC3H/HetJマウス6匹からなる2つのグループに、それぞれ、純度8000ミクログラムのCR2-1gG1(黒四角)またはIgG1(白四角)を、分割して、4×10<sup>6</sup>のヒツジEを免疫する直前、免疫中及び免疫後17時間以内に投与した。3番目のグループのマウスにはPBSのみを投与し、免疫を行わなかった(白丸)。5日ごとに、特異的抗体濃度をELISAで測定した。データは、反応の最も高い個体と低い個体を除いて残ったマウス4匹の結果の平均値±標準偏差(SEM)で示す。

第13回 \*\*\* I標識組換えIgG1、CR2-1gG1、及びFCR2-(F<sub>a</sub>b')<sub>2</sub>のマウス血清中における半減期。

第14回 cCR1/pBSCR1c、及びSCR-BからIgG1が免疫グロブリン重鎖に連結しているCR2-(F<sub>a</sub>b')<sub>2</sub>による、\*\*\* I-C3b-二重体のヒトEに対する結合の阻害。

第15回 cCR1/pBSCR1c及びCR2-(F<sub>a</sub>b')<sub>2</sub>による、抗体に連絡されるヒツジEのヒト血清中における治療の阻害。

第16回 cCR1/pBSCR1c及びCR2-(F<sub>a</sub>b')<sub>2</sub>による、チモサン処理したヒト血清中におけるC5a-d-e-Ar-gの生成阻害。

第17回 cCR1/pBSCR1c及びCR2-(F<sub>a</sub>b')<sub>2</sub>による、チモサン処理したヒト血清中におけるC5a-d-e-Ar-gの生成阻害。

第18回 CR1-F(F<sub>a</sub>b')<sub>2</sub>コンストラクトの配列が次のように示されている。P<sub>s</sub> L1が示されている。SCRの8番目から11番目までを含むCR1のスクレオチド1501から2262までを本ベクターのP<sub>s</sub>L1部位にクローニングした。IVS-1gG1リーダー介在型；スクレオチドは、CR1リーダー-スクレオチド28-150、そしてCR1のN端-スクレオチド151となるように番号をつけてある。

発明の範囲を説明

本発明の一つの特徴は、標的部に対する認識部位を持ったポリペプチドが免疫グロブリン鎖のN端部分に付けられている融合タンパク質を企図している。本組合タンパク質は遺伝子組み換えシステムにおいて産生される。目的とするポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNA配列を免疫グロブリン鎖のための発現ベクター内に挿入し、改変された本発現ベクターの翻訳が、認識部位に相当するポリペプチドの前半分を保すリーダー配列を含むポリペプチド、およびそれから実質的に完全な免疫グロブリン鎖を生じるようにする。この改変された発現ベクターを、前述の補助免疫グロブリン鎖を生産する能力を好適に有する宿主細胞に入し、本ベクターが翻訳されると、本宿主細胞が、あるタイプの免疫グロブリン鎖のN端に説明された認識部位に相当する外因性のペプチド配列を持つ完全な免疫グロブリン分子に相当する分子を分泌するようになる。“免疫グロブリン分子”および“抗体”という用語はF<sub>a</sub>b<sub>1</sub>および(F<sub>a</sub>b<sub>1</sub>)<sub>n</sub>などの、完全な抗体タンパク質のフラグメントを含んでいることが理解される。

#### ポリペプチド

本発明のこの特徴により企図されるポリペプチドは、疎水性環境において維持される固有の3次元構造をとり、標的分子を認識する部位を含んでおりポリペプチドのいづれも広く包摂しており、本ポリペプチドのアミノ末端およびカルボキシ末端は水性溶媒に比較的利用しやすいものである。好適なポリペプチドは、認識能に不要な領域を除いたり利用しやすいアミノおよびカルボキシ末端を残したりするために任意に切断されるCR1およびCR2などの種々の受容体の認識ドメインに相当するものである。本ポリペプチドの便利な末端により、結合部位の3次元構造を乱すことなく、そのアミノ末端にリーダー配列をつけたりカルボキシ末端に免疫グロブリン鎖の残りの部分をつけたりすることが可能となる。

本発明の融合タンパク質を作るために付加される認識ポリペプチド部分は免疫グロブリン配列の末端に付加されるので、免疫グロブリンの構造に寄与する要素は置き換えられない。それ故、本来の構造を破壊することにはならない。その結果、特異的な認識能力を持つかかるポリペプチドも、本ポリペプチドが個別の構造を形成し疎水性溶被中に安定でアミノ末端およびカルボキシ末端を利用しやすいうならば、タンパク質に取り込まれる認識領域または結合領域の基本として使

用することができる。

本発明は、認識部位の基本として使われるタンパク質が1箇所で、その認識部位に結合する複数の分子が複数の結合部位を持っている場合に特に適している。1箇所の結合部位のKdが1マイクロモルまたはそれより高い場合、本発明の抗体（本抗体の各段の少なくとも1つの値は付加された結合部位を含む融合タンパク質である）はより大きな親和性（つまりKd<1マイクロモル）で結合する多価の結合タンパク質である。例えば、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインなしで調製されたCR2の可溶性はKd=3.5 nmで結合する（実験例2、下記）。

本ポリペプチドが1つまたは複数の個別の構造を形成し、その結果生じる結合されたタンパク質が発現され可溶性であるならば、ポリペプチド自体が複数の結合部位または認識部位を任意に含むことができる。ポリペプチドの大きさは、大きすぎても動物組織への拡散が過度に制限されるような融合タンパク質を作らない程度であることが好適である。

ポリペプチドの別の好適なグループは、短い繰り返し共通配列（SCR repeat consensus sequence）：その多くは複数の蛋白質フラグメントの构造に関与している）から成るものである。これらの分子の認識ドメインまたは結合ドメインは、少数のSCRから成る。その配列が調節したSCRの間に位する残基で始まりをして終わるポリペプチドを使用すると、その結果得られるポリペプチドは、個別の3次元構造および利用しやすい末端という求める特性を持つであろう。以上のことから、求める結合部位を持つが、認識部位に関与しない他のペプチド配列が実質的に無いポリペプチドを生成することが可能である。短い繰り返し共通配列（SCR）からなるタンパク質のグループは、C1r、C1s、ファクターB、C2、ファクターH、C4BP、DAF、MCP、C6、C7、インテロキシング受容体アルファ版、ベータ-2-グリコプロテインI、およびファクターXII同様、補体受容体CR1およびCR2を含む。

本発明のこの特徴により企図されるポリペプチドはSCRからなるポリペプチドに限定されるものではない。それらは、求めるエピトープ、CD4、CD19

T細胞受容体などを含むいかなる種類の受容体、またはC3d g認識部位などの、受容体に特異的な分子構造を含むペプチドを含んだ（しかしそれだけに限定されてはいない）求める3次元ペプチドのいづれであってもよい。

#### 免疫グロブリン鎖

本発明の融合タンパク質は本ペプチドをいづれかの免疫グロブリン鎖に連結させたものであってもよい。インクタクト抗体分子は脛髄系において安定であり、融合タンパク質の実質的な安定性が要求となる場合には、それを融合タンパク質の抗体部分によって供給することもできる。多くの状況において、通常、動物内に存在しないエピトープに特異的な抗体を利用することも求めることができよう。本発明は、しかしながら、通常、動物内に存在するエピトープに特異的な抗体を使用することも企図している。その抗体の抗原結合部位の特異性は、融合タンパク質の構造を容易にするために選ばれてよい。

異なるアイソタイプの免疫グロブリン鎖を使用することもできる。好適なアイソタイプは本組み換え融合タンパク質の最終用途に依存するであろう。ガンマ鎖はFc受容体に結合する可溶性融合タンパク質の產生を指示するものであり；アルファ鎖は脛髄に結合する融合タンパク質の产生を指示するものであり；イグシロン鎖は肥溝細胞に結合する融合タンパク質の产生を指示するものである。ポリペプチド認識配列はN端（免疫グロブリン分子の可溶部の一部）についてもよいので、F<sub>a</sub>b<sub>1</sub>および(F<sub>a</sub>b<sub>1</sub>)<sub>n</sub>などの免疫グロブリンフラグメントも、可溶部が存在する限りにおいては本発明によって企図される。

F<sub>a</sub>bもししくは(F<sub>a</sub>b<sub>1</sub>)<sub>n</sub>分子は、底面ヒンジ部の後ろでのタンパク質分解性の切断あるいは終止コドンの導入によってFc領域を失わせることにより產生することができる。本融合タンパク質の最終的な治療用途に依存して、Fc受容体を介した抗体活性化複合体の除去を提供するため、本融合タンパク質の免疫グロブリン部分において非抗体活性化アイソタイプのFc領域を維持する方が好適な場合もある。

#### 表現系

改変された免疫グロブリン発現ベクターは、プロモーター、リーダー配列、および求めるポリペプチド結合領域に相当する配列を組み合わせることによって、

新たに構築することができる。これらの配列に相当するDNA配列は、核酸合成、ポリメラーゼ遮蔽反応、およびゲノムまたはcDNAへの分子クローニングを含めた、既く知られた種々の方法によって得ることができる。プロモーターおよびリーダー配列は、免疫グロブリン鎖を含め、複数のタンパク質を発現させる技術において非常に有用である。その有用なプロモーターおよびリーダー配列は、本プロモーターが発現を、そして本リーダー配列が発現用に選ばれた宿主系において正しく折り畳まれた組み換えタンパク質の分子を指示するものであれば、いかなる組み合わせによっても利用することができる。

適当な免疫グロブリン鎖配列は本分野ではよく知られている。免疫グロブリン鎖をコードする配列は、発現を指示するプロモーターと分離を指示するリーダー配列を含む発現ベクターにおいて好適に提供される。発現のためのエンハンサーも本ベクターに含まれていることが最も好適である。そのような発現ベクターは本分野において非常に有用である。例えば、一つもしくは複数の免疫グロブリン鎖をコードする発現ベクターの多くはアメリカンタイプ、カルチャーコレクション、Rockville、メリーランドより入手可能である。

特に好適なベクターはpSNR021と名付けられた、マウスガンマ-1ゲノムクローンであり、これは、分離を指示するネイティブリーダー配列の後に免疫グロブリンプロモーターの初期下にある、ハバテン、4-OH-8ニトロフェノニアセチル（NP）に特異的なマウスガンマ-1重鎖の配列および発現エンハンサーを含んでいる（ペラード（Ballard）ら、(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 9826-9830、本明細書中では参考文献に取り入れられている）。免疫グロブリン鎖のいづれか一つの発現および分離を供する他のベクターも本発明において似くものである。発現ベクターの選択は、この2つの事項を両立させなければならないので、改変ベクターの発現に使用される宿主細胞に型に依存するものである。

求めるポリペプチドおよび免疫グロブリン鎖のためのDNA配列を得るために有効な方法が本分野の技術内にあることは容易にわかり、免疫グロブリン配列および求める認識部位に相当する配列の両方を含む改変ベクターは、本分野によく知られたいづれの方法を用いても調製することができる。例えば、ある改変ベ

特表平5-507197 (6)

クターは、免疫グロブリンの5'端近くの発現ベクターの配列中に切断部位を見出だし、その切断部位を導入部位の構造に利用することによって遮断することができる。次に、導入部位のための認列を本発現ベクター中に導入する。その導入部位は、分離を指示するリーダー配列の3'側になければならない。

求める結合タンパク質の発現を容易にするために、短いオリゴヌクレオチドをセグメントの一端もしくは両端に付けることもできる。例えば、切断部位がコードンに一致しない場合は、本ポリペプチドと本免疫グロブリンの両方の読み替を保持するために、付加的なヌクレオチドを読み替わらせる。改変ベクターの配列はリーダーペプチドの切断シグナルをコードしていないなければならない。好適な様式では、免疫グロブリン配列の最初の1-10アミノ酸のコードンは、リーダーペプチドを切断する酵素が切断部位を研究に認識できるよう、導入した配列の5'側に保持される。完成した分子の免疫グロブリン部分が正しく折りたまれるように、これらと同じアミノ酸のコードンを導入した配列の3'側に張り返してもよい。

2つの個別な構造間にブリッジを形成するためには、ポリペプチド配列の3'端と免疫グロブリンをコードする配列の5'端との間に、付加的なアミノ酸をコードする配列が含まれていてよい。このようなブリッジは、2つの個別な構造が互いに干渉することなく、発現したタンパク質が正しく折りたまるよう、付加的な柔軟性を提供し得る。本ブリッジは、抗体の2つの腕にあるポリペプチド配列の結合領域が複数の分子上の多数の結合部位の3次元的面倒に対し空間的に適応できるための柔軟性にも寄与することができる。

本ブリッジペプチドは、水溶液中でのその機能を促進し、哺乳動物の細胞系に見出されるプロテアーゼに耐性ない、親水性および親水性アミノ酸の混合物から構成されるべきである。本ブリッジは10またはそれより少ない数のアミノ酸を含むことが好適である。特に好適なブリッジはアミノ酸、バリンおよびセリンから成るペプチドである。ブリッジは様々な利益をもたらし得るが、正しい読み替が維持され、結合タンパク質の他の部分によってポリペプチドまたは免疫グロブリンの部分のフォールディングが影響されない限りは、その存在は必要ではない。

例によると、原核生物の宿主細胞を、例えば本免疫グロブリン配列が、Fc部を含まずそれ故而駆除後のグリコシル化を要しないFabフラグメントに相当する場合に、本結合タンパク質の発現に使用してもよい (ペーター (Peter) ら, (1987), *Science*, 240: 1038-1041を参照)。

組み換え結合タンパク質をコードする配列を含む改変発現ベクターは、エレクトロボレーション、リボフェクションなどの本分野で広く使われている技術のいずれかによって宿主細胞に入ることができる。細胞を増殖させ結合タンパク質を発現させるための条件は、使用される特徴の宿主細胞およびプロモーターに依存のもので本分野ではなくよく知られているものである。改変ベクターを含み複数の免疫グロブリン鎖を発現する宿主細胞は、正しく折りたまれ、本鎖の一方のN末端に結合された結合領域を含むポリペプチドをもった抗体分子を分離することができる。宿主細胞がいずれの免疫グロブリン鎖も発現しない場合、2つのタイプの免疫グロブリン鎖 (重鎖および軽鎖) に相当し、異なる結合領域をコードするポリペプチド配列を各々持つ2つの改変ベクターを本細胞に導入することができる。そのような細胞は、各鎖が2つのN端にそれぞれ付けられた2つの異なるポリペプチド結合領域を持つ抗体分子を分離するであろう。

本組み換え結合タンパク質は、改変された宿主細胞を標準的手法を用いて増殖させる発現または培養プロセスから回収できる。宿主である細胞は通過などのいずれの簡便な手段によっても取ることができます。本結合タンパク質は、簡単的な生化学的分離手段によって回収できる。特に有用な方法はアフィニティクロマトグラフィーである。本組み換え結合タンパク質は多くの特異な結合部位を有している: 元の免疫グロブリンの抗原結合部位、N端に導入された認列部位、およびFc部位などの免疫グロブリン分子に特徴的な他の部位である。これらはいづれかと相補的なものを含むアフィニティクロマトグラフィー系は普段の研究者によく知られた操作によって本結合タンパク質を精製するのに利用することができます (*Methods in Enzymology, Volume 34, ジャコビ (Jacoby) ら編, Academic Press N.Y., 1974*)。好適な様式においては、選択されたベクターは4-ヒドロキシ、3-エト

本ポリペプチドをコードするDNA配列を本ベクターに導入し、本組み換え結合タンパク質が発現されたときに、ポリペプチドが免疫グロブリン鎖のN末端についているようになる。最も好適な場合は、本ポリペプチドがブリッジの両方に拘らず免疫グロブリン配列の最初のアミノ酸に結合されているものである。より広く言えば、免疫グロブリン鎖のS次元構造が発現の際に離れなければ、本ポリペプチドはN端のいづれのアミノ酸に結合されてよい。

組み換え結合タンパク質の型別  
本改変発現ベクターを発現させるための細胞系列の選択は最大ではない。一般的に、正しく折りたまれた免疫グロブリン分子を発現し、IgMやIgGで起こるいづれの細胞膜も発現されることから、哺乳動物の細胞系列が使用されるだろう。本発明のベクターを発現させることのできる細胞系列は容易に入手できる (例: アメリカン タイプ カルチャーロコレクション会員)。好適な細胞系列は、本発明の改変発現ベクターにコードされる様に相補的な糖を分泌するミエローマである。そのような細胞を生産する方法はシェネ (Schneec) ら, (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6904-6908 (本明細書中では参考文献に取り入れられている)において説かれている。特に有用な細胞系列はJ558Lと命名されたマウスミエローマ細胞であり、これは本分野の多くの異なる研究者によって利用されている (バードら, (1986); ブルッゲマン (Bruggeman) ら, (1987); ガスコーン (Gascoigne) ら, (1987); オア (Oar) ら, (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 825-829; トラウエッカ (Trauecker) ら, (1986); Eur. J. Immunol., 16: 851-854; ツヴァン (Tzvan) ら, (1988); J. Immunol., 141: 308-314; ウィリアムズ (Williams) ら, (1986); Gene, 43: 319-324)。この細胞系列は免疫グロブリン鎖 (ラムダ) 鎮を生産するが、重鎖を生産する能力を失っている。

異なる免疫グロブリン配列を持つ発現ベクターとともに、もしくは、あるいは異なる種からの異なるタンパク質のプロモーターおよび/またはリーダー配列とともに使用するに適した他の細胞系列は、通常、本分野に適応したのには各

ロフェノセチルに特異的な免疫グロブリンモイエティを有しており、本キメラタンパク質の抗原結合部位を結合するであろうアフィニティマトリクスはブルックマンら, (1987) (本明細書中では参考文献として取り入れられている)により記載されたようにして選択することができる。

組み換え結合抗体アノログ

好適な細胞においては、本発明の組み換え結合タンパク質は、抗体結合部位をもつSCFを基盤とした多段のポリペプチド認列部位を含んでいる。このような結合領域は一般には1マイクロモルあるいはそれ以下のKdを持っており、このことは後述の治療手段における利用にとって十分すぎるものである。ポリペプチドが免疫グロブリン鎖についていけば、本発明の細胞によって産生される抗体分子は少なくとも2つの結合部位を持っている。なぜなら抗体の名説はポリペプチド結合部位をコードする改変ベクターからの頭を一つ含んでいるからである。また、本細胞は、それぞれが免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードし各々の鎖がN末端に付いた結合部位をもつ2つの改変ベクターを含んでもよい。これらのベクターにコードされるポリペプチドは同じ (この場合、抗体は重鎖の分子に対し4つの結合部位を持つことになる) にすることも異なる (この場合、抗体は2つの異なる重鎖の分子に対し各々2つの部位を持つことになる) ようにすることも可能である。

多段の結合部位を含み本免疫グロブリン結合タンパク質と同じ特徴性を持つ巨大分子コンストラクトも、本発明により企図される。巨大分子コンストラクトは、可溶性の生理学的に許容し得る巨大分子抗体に付けられた結合部位をもつSCFを含む複数のペプチドを含んでいる。

本抗体は通常系に可溶性生理学的に許容し得る巨大分子である。ここで生産学的許容とは、本分野に熟達したものが企図法の一環として患者に上記抗体を注射することを認めるであろうという意味である。本抗体は許容には前述で比較的安定であり、過去に関しては許容し得る血清半減期を持つ。適した抗体は、血清アルブミン、ヘパリン、または免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリエチレンジコールまたはポリオキシエチルポリオールなどのポリマー、あるいは例えばポリエチレンジコールで隣接することにより抗原性を減じるよう改変された

タンパク質を含むか、それだけに制限されるものではない。過した抗体が本分野では知られており、例えば米国特許4,745,180および4,847,325およびその参考文献に記載されている。

抗体結合部位を持つSCRは、巨大分子抗体への化学的結合が使われる場合にSCRペプチドの半端の便利性が要求されなくともよいということを除けば、免疫グロブリン結合タンパク質に因して上述したものと同じである。

本コンストラクトは多くの手法により構成できる。抗体がタンパク質の場合、粗体につけられた多コピーボリペプチドを含む融合タンパク質が発現されるよう、粗作用の発現ベクターに本ボリペプチド配列をコードするDNAを挿入する、組み換えたDNAによって本ペプチドをつけることもできる。免疫グロブリンのN端領域以外の部分に架がれたSCRペプチドは本特許の範囲内である。本SCRはCR1抗体またはCR1c、C1s、ファクターB、C2、ファクターH、C4BP、DAF、MCP、C6、C7、Ig-L2受容体アルファ、ベータ-2-グリコプロテイン1およびファクター-XIIを含むタンパク質粗体を含む他の抗体SCRなど、特有の性質を持った別のボリペプチドに融合される可能性もある。また、本ボリペプチドは、例えばボリペプチドのうちあるいはボリペプチドと結合配列の配列をコードする発現ベクターからの発現により、独立に発生することができる（例えば、米国特許4,894,443記載）。また、本ボリペプチドは受容体タンパク質のタンパク質分解性の切削によって得てもよい。これによりボリペプチドは本発明により企図された個別的情況と抗体結合部位という特性を持たざるとなる。ボリペプチドを独立して持る場合、次にそれを、本分野ではよく知られた化学的結合技術によって抗体によって結合させる。

以下の検査を通じて本発明が、記載されている治療において本発明の組み換え融合タンパク質に適していることから、抗体結合部位を持つSCRを含む複数のボリペプチドを有す巨大分子コンストラクトを企図していることが理解される。

#### 治療用途

CR1またはCR2またはその両方に見られる結合部位に相当する、粗抗体フラグメントに対する結合部位を有すコンストラクトを企図することができる。CR

2に相当するコンストラクトはC3d<sub>8</sub>およびIC3bなどのC3フラグメントに、またはE BVおよびEBV感染タンパク質をp350/220に結合する。1価のCR2分子は好適な治療薬ではない。C3d<sub>8</sub>コートされたp350/220に対する親和性が優れて低いからである。リソンドに対する親和性は結合領域によって高くなるので、多価CR2分子は好適な治療薬である。下記の実施例2において、抗体を基本とし、C3d<sub>8</sub>およびEBVに対する2価受容体を含む2競合コンストラクトであるCR2-Igの親和性は1価の受容体に比べそれぞれ4000倍（対C3d<sub>8</sub>）および10倍（対EBV）高くなっている。

CR1の抗体結合部位はC3b（LHR-BまたはLHR-CのN端SCRの結合部位を使用する）、C4b（LHR-AのN端SCRの結合部位を使用する）あるいはその両方に結合するコンストラクトの基礎を形成することができる。

2つの改良発現ベクター（一方は片方の付けられた抗体受容体部位の結合領域を持つ免疫グロブリン軽鎖を基本とする融合タンパク質をコードし、もう一方はもう片方の付けられた抗体受容体部位の結合領域を持つ免疫グロブリン重鎖を基本とする融合タンパク質をコードする）が使用される場合、C3bとC4bの両方に結合するコンストラクトを得ることができる。これらの両ベクターの他には抗体を分泌しないミエローマ細胞をトランスクレットすることによりC3bに対して2つC4bに対して2つの部位を持つ抗体が分泌されるであろう。また、C3bおよびC4b結合部位を含むSCRを免疫グロブリン頭のN端に tandem に付け、C3bに対して2つC4bに対して2つの部位を持ちC3bとC4bの両方に結合するはずの抗体を発生することができる。

CR1を基本とした初期構造結合タンパク質が製造されている（フィアロン（Fearon）ら、1989）が、本発明にしたがって製造されるコンストラクトは、本コンストラクトの抗体部分の安定性に基づき哺乳動物の培養系において高い安定性を持つであろう。いつれかの抗体受容体からの部位を含む免疫グロブリン結合タンパク質の半減期は元の免疫グロブリンの半減期（6-8日とされている（ビエイラ（Vieira）ら、（1988），Eur. J. Immunol. 18:313-316）によるとある。本コンストラクトの治療半減期は少なくとも約

1時間であることが望ましい。本コンストラクトが抗ウイルスまたは抗炎症反応に使用される場合は、本コンストラクトの血清半減期は少なくとも約10時間、好適には少なくとも約1日であることが望ましい。半減期は本分野で知られている免疫学的ルーチン技法により容易に測定することができる。

本発明のCR1免疫グロブリンキメラは、CR1配列のSCR8から11まで（C3b結合ドメインに相当する）を含み、これが免疫グロブリン重鎖のNH2末端領域に付けられるように構成された。このコンストラクトはC3b結合を介したCR1/pBS-SCR1cの別の経路の機能活性を維持し、キメラの免疫グロブリン部分に特徴的なIn-vivoでの安定性を保持していた。免疫グロブリンにより与えられるIn-vivoでの特徴は、このようなコンストラクトをCR1が與する抗体および障害の治療のための肝臓表面分子に対する、そのような疾患および障害は、不適当なまたは望まざる抗体活性化の間接する疾患（血栓形成疾患、經急性和慢性的疾患および免疫修飾拒絶反応、インターロイキン-2（IL-2）治療の際のIg-L2誘導性毒性、AIDSなどの血液学的悪性疾患など）；感染症（細菌、AIDS、および真菌症など）；炎症、障害（自己免疫疾患、成人呼吸困難症候群、クローン病、熱損傷、火傷および皮膚などに現れるよう）；免疫結合障害（自己免疫疾患、リューマチ橋膜炎、全身性エリテマトーデス、増殖性貧血、糸球体腎炎、溶血性貧血、および真菌性腫瘍など）；神経学的疾患（多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、卒中、外傷性脳損傷およびバーキンソン病など）；および既往血再灌注状態（心筋梗塞、風船血管形成、および心筋バイパス形成手術における後ポンプ症候群など）を含むがこれだけに限られるものではない。

免疫応答におけるCR2の生物学的役割の知識は、そのポテンシャルがポジティブ、フィードバックループ（免疫複合体による過剰な抗体活性化がB細胞のさらなる活性化をもたらしより多くの免疫複合体を形成する自己抗体のさらなる生成をもたらす）のために存在することを示すのに十分である。C3d<sub>8</sub>を含む複合体に対する細胞表面受容体と競合する可溶性CR2は、この複体によるB細胞活性化へのポジティブ、フィードバックループをブロックできた。

抗体結合部位を有した可溶性コンストラクトは、上記コンストラクトの役目が

抗体の活性化および細胞の抗体依存性活性化を阻害するような場合には、抗体依存性細胞活性化に関する多くの疾患状態の治療に使用することもできる。このような疾患状態は、自己抗体免疫複合体疾患（免疫性血小板減少、全身性エリテマトーデス、腎炎抗核抗体、間節炎、自己免疫性溶血、糸球体腎炎、多発性硬化症、天疱瘡、クリオグロブリン血症、およびAIDSなど）、エプショウイン・パールウイルス関連疾患（ショグレン（Sjögren）症候群、リューマチ橋膜炎、ペーキー・キットリンハ症、ホジキン病、ウイルス（AIDSまたはEBV）関連性B細胞リソバ腫、慢性疲労症候群、リーシュマニアなどの寄生虫および免疫抑制された疾患状態（免疫細胞移植後またはAIDSにおけるウイルス感染など）を含むがこれに限られるものではない。

E BVは、ウイルス感染における重要なステップとしてB細胞上のCR2に結合する。C3d<sub>8</sub>は抗原と複合体を形成し、B細胞上のCR2受容体と結合して抗体活性を活性化する。好中球およびマクロファージ上のCR3と結合したIC3bにより炎症が引き起こされる。炎症の間、IC3bは好中球上のCR3に結合し内皮細胞への接着を促進する。炎症の間、C3bとC4bは細胞に結合したCR1を介して他のタイプの細胞と結合する。

CR2-Igなどの、CR2を含むコンストラクトはEBVに対して細胞に結合したCR2と結合し、EBVの細胞への結合を減少させEBVの感染を阻害する。このようなコンストラクトはC3d<sub>8</sub>に対しても競合し、従ってB細胞の活性化を阻害するであろう。この作用は、リューマチ橋膜炎および全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患において特に重要である。IC3bへの結合により、本コンストラクトは好中球およびマクロファージによる炎症作用を阻害することができる。本コンストラクトは炎症を抑えるはたらきをすることもできる。

本発明において、免疫グロブリン重鎖のN端に付けられたCR1のSCR1および2を含むCR2免疫グロブリンキメラが構成された。このキメラ分子はIn-vivoでT細胞依存性およびT細胞非依存性の両方の免疫応答について免疫抑制を示し、C3への受容力を介して免疫応答を高める複合受容体としてのCR2を同定した。この発見は、In-vivoでのB細胞活性化におけるCR2の役割を示す多くの研究にたいするIn-vivoでの相關現象を提供し、

特表平5-507197(8)

CR2と交差反応するマウスCR1に対するモノクローナル抗体がマウスにおける抗体反応を阻害したという以前の観察結果を明確にするものである。CR2がCD19/CR2複合体のリガンド結合サブユニットであることが示されたことと相俟って、CR2-IgG1の免疫抑制作用は、CD19/CR2複合体の機能遮断能が抗原に対するB細胞の上昇への応答を増加させるという生物学的意義を持つことの最初の証拠を提供するものである。可溶性CR2-IgG1キメラは、抗原に対するB細胞の上昇への応答を阻害できるところから、治療面において不適当あるいは望ましくないB細胞活性化を示す疾患または障害を治療するのに有用なはずである。上に挙げた疾患および障害に加え、このようなキメラは、(例えば、同様多糖片被覆の)免疫抑制または他の治療に使用される真菌多糖片モノクローナル抗体に対する、望ましくない一次抗体反応を防ぐのに有用なはずである。

CR1抗体を基とする結合領域を持つコンストラクトは、重定向能力において血中に固定した組織抵抗および望ましくない細胞活性による他の障害を抑えることを含め、可溶性CR1に匹敵する抗体阻害機能を持つであろう。しかし本コンストラクトは可溶性CR1よりも上昇への長い半減期を持ち、組織の炎症部により広く活性化する能力を持つことであろう。

抗体を活性化する寄生生物、細菌および酵母(即ち、リーシュマニア、肝虫虫)はCR3を用いて細胞に入り込み増殖サイクルを開始する。抗体受容体認知配列を持つコンストラクトは寄生生物上の受容体結合部位をマスクし、融合タンパク質のガンマー1鎖のFcドメインを介してその結合部位をFc受容体へと送り込むであろう。このようにして寄生生物は、CR3以外活性作用によって好中球内(ここでは寄生生物は動物の防御機構から保護される)に取り込まれるのではないか、Fc受容体活性化のバーストにさらされることになる。

種々の細胞生存性現象を阻害するような動物の治療は、本発明により提供される組み換えタンパク質またはコンストラクトの投与により達成することができる。細胞以外の蛋白分子に結合する認識ペプチドを持つ組み換え免疫グロブリン組合タンパク質は、種々の蛋白分子の細胞への結合による細胞現象を阻害するために治療面において利用される。

対する結合サイトは二つのアミノ末端の短い共通通り返し配列(SCR)に位置している(Lowell, et al., (1980), *J. Exp. Med.*, 150: 1931-1946)。これらSCRはガンマー1鎖をコードするネズミのゲノミック重複DNAの5'末端にクローニングされた。得られた融合タンパク質はネズミのミエローマ細胞系でうまく発現され、CR2-IgG1と名付けられた。

#### ネズミのゲノミック ガンマー1DNAへのCR2のクローニング

Ballard, et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9626-9630に従ってpSNR021と名付けられたネズミ ガンマー1 ゲノミッククローン(参考文献の表題付)はアミノ酸5番目と6番目の間にPstIサイトを含んでおり、安定した宿主への組み込みによって、G418耐性を与える。CR2の最初の二つのSCRを含んでいるEcoI-XbaI断片はcDNAクローン(Neiss, et al. (1988), *J. Exp. Med.*, 167: 1047-1056 に基づく)から再構成された。二つの短いオリゴヌクレオチドは、ガンマー1DNAのPstIサイトとにCR2断片を挿入することができるよう作成された。3'オリゴヌクレオチドはCR2とYH鎖の間の柔軟な連結のためにアーリンとセリソをコードしていた(図2の配列参照)。こうして得られたクローン(pSNR02)はアミノ酸1-5で剪ぎ始めるネズミガンマー1鎖をコードする(図1,2,3, 参照)。

#### エレクトロポレーションと選択

J558L ミエローマ細胞系はJ.L.Morrison博士の厚意で提供された。それは9% v/vの仔ウシ血清(BCS)を添加したRPMI1640培地("ATCC Catalog of Cell Lines and Hybridomas," 6th Ed., 1988, pp. 353-4)で培養された。

J558Lはラムダ軽鎖を合成するJ558(ATCCアセッションナンバー#TIB-6)の重鎖を失った変異株である。pSNR021および修飾されていないガンマー1DNA(pSNR021)はPstIを用いて直接化された。ミエローマ細胞はエレクトロポレーションでトランスクレクションされ、24時間後にG418(1mg/ml)の添加により選択され、マイクロライターブレードにクローニングされる。

得られたクローンは選択され、上清はELISAによってIgG活性を測定された。

上記の方針において、本化合物は、例えば点滴または巨大量などの局所的な経皮的によっても投与されることがある。種々の副作用が知られており、これらは混合タンパク質およびコンストラクトの服用に使用することができる。これにはリボソームによるカプセル化、颗粒、またはマイクロカプセルが含まれる。他の導入方法には皮内投与、筋肉内投与、腹膜内投与、静脈投与、皮下投与、脳室内投与、および経口投与が含まれるがこれだけに限らずである。

本発明はまた、医薬組成物を提供する。そのような組成物は治療上有効量の混合タンパク質または構造物および、体内で許容される液体を含んでいる。このような液体は、生理食塩水、平衡化された生理食塩水、デキストロース、および水を含んでいるがこれらのみに限定はされない。

典型的な液体は静脈注射による投与用の組成物は、滅菌された等張水活性銀街液に溶解されている。必要であれば、組成物は防腐剤および注入部位の痛みをやわらげるためにリグノカインのような局所麻酔剤を含んでもよい。一般に、各成分は単位服用量に別々に、または混合されてアンプルまたは少量入りの袋といった密閉した容器に、活性単位で算出した活性のある要約量を示して供給される。構成物が注入によって投与される場合は、滅菌した医療瓶の「注射用水」または生理食塩水を含む注入器で溶解されることも可能である。構成物が注射によって投与される場合は、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルは、各成分が後方に混合されるために、提供してもらいたい。

医薬組成物の一つまたはそれ以上の成分で調和された、一つまたはそれ以上の容器を含む製剤のパックもまた、本発明の範囲に含まれる。

組成物はタンパク質の血漿レベルが約1から100 μg/mlの範囲を維持するよう投与されるが、これは混合タンパク質または構造物の特異的結合反応に必要な範囲に亘っている。

以下に示す実験例は説明のためにのみ含まれており、本発明の範囲を限定するることは意図しない。

#### 実験例

ヒトタイプ2抗体受容体(CR2, CD21)は、ヒトC3dおよびエプシクタイン-ペル-ウイルス(EBV)のリガンドである。これら二つのリガンドに

これは、以下のようにして行なわれた:

ネズミIgGのFc断片に対する抗体は粗面培養上清中に存在するいかなるIgG1をとらえるようにマイクロライターブレードのウェルに固定化された。ネズミのイムノグロブリンのラムダ軽鎖に特異的な、ペルオキシダーゼでラベルされた二次抗体は、結合の後、プラスミドと粗株のミエローマ細胞からのラムダ軽鎖由来のガンマー1鎖を含む完全なIgGの存在をシグナルで示す。

#### タンパク質の精製

発現されたタンパク質CR2-IgG1とIgG1は記述された方法にしたがって(Broome, et al. (1987), *J. Exp. Med.*, 165: 1351-1361) NP-セファロース上のアフィニティカラムトラップによって培養液上清から精製された。SDS-PAGEによる解析によって精製されたタンパク質は、粗株はそのサイズが大きく、CR2-IgG1キメラの粗株はIgG1の場合よりも19kD大きいことが明らかになったが、これはK-グリコシレーショングルコース結合する二つのサイトを持つSCRが二つ存在すること、整合性を示していた。図9参照。

#### 実験例2 ヒトC3dの粗面結合したCR2に対する重複物の競合を分析する結合

N562細胞(ATCCアセッションナンバーCLL243)はLowell, et al. (1989)に従って精製されたヒトCR2の配列を含む発現ベクターで、リボフェクション(Beethova Research Laboratories, Inc.)によってトランスクレクションされた。グルタルアルデヒドで固定されたC3dは<sup>125</sup>Iでラベルされた(pC3d)-*Carler*, et al., *J. Immunol.*, 143:1755-1760)。細胞は1 μg/mlのpC3dととともに、増大する濃度のIgG1または実験例1のCR2-IgG1の存在下あるいは非存在下で、氷上で30分培養されたのち、増量のジブチラーおよびジニルフタレートの混合物中で遠心操作された。沈殿中および上清中の放射活性はガンマカウンターで測定された。

IgG2細胞に於ける結合C3dのCR2との相互作用は5mMの濃度の粗面え可溶性CR2-IgG1によって50% 阻害される(図4)。可溶性で、切断された形の、既製過剰量及び細胞内粗面を欠いたCR2に対するC3dの単価の結合は、IC50が27.5 μg/mlで生じる(Moore, et al., (1989))。従って、キメラタンパク質の二つの腕の中にある二つのCR2結合領域はpC3dと相互作用し、2箇所の結合反応を引き起こし。

特表平5-507197 (9)

アフィニティーを実験的に検める。

**細胞結合したEBV タンパク質に対するCR2-IgG1の結合**

B95/8 細胞 (ATCCアッセイナンバー #CRL 1612) は40ng/ml のPMA (フルボル ミリストート アセテート) が、Bolyniuk, et al. (1970) *J. Virol.*, 17:935-949において記述されているように、EBVの発現と分泌を標準するため、添加されていることを除けば、実施例1で用いられたと同じ培地で培養された。

IgG1およびCR2-IgG1は $2.67 \times 10^4 \text{ M}_\text{w}$  および $2.37 \times 10^4 \text{ M}_\text{w}$  という特異的活性で<sup>12</sup> 1%でペルされた (Fraker, et al., (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 80:849-857)。感染されたB95/8 の生育可能な細胞はフィコールーパック (Pb arsenite) 上に蓄積した。細胞はリガンドと共に氷上で30分間培養され、等量のジブチル-およびジノニルアミノラートの混合物中で遠心洗浄された。沈澱および上清中の放射活性はガムマーカウンターで決定された。

放射標識されたCR2-IgG1はB95/8 細胞で発見しているEBV タンパク質に、0.5nM のアフィニティーで結合した (図5)。これは、単価の結合のKdは $8.2 \text{ nM}$  であったように、CR2 のEBV への2種の相互作用を再び示唆している (Hoore, et al. .. 1989)。

**マウスまたはヒト血清で標識された抗体によるCR2-IgG1の取り込み**

CR2-IgG1のネズミおよびヒトC3断片との相互作用は<sup>13</sup> 1%で標識されたキメラのダイモサン粒子への取り込みの測定によって比較された。このダイモサン粒子は、それぞれマウスまたはヒト血清中で、その他の経路の活性化を許容するIgE1 およびIgG1の存在下で、あるいは、相補する活性化を阻害するEDTAの存在下で、保護されたものである。これらの複数の活性化粒子は、主としてIC3b およびIC3b断片で被覆されており、IC3bはC3a凝集を含み、CR2 においてC3dと同じアフィニティーで同じサイトに結合する。

CR2-IgG1は、ヒトおよびマウスC3断片で、それぞれ、キメラはヘテロナリガンドに対する方が、ホモロガスなリガンドに対するよりも、高いアフィニティーを持つことを示す、 $10.0 \pm 8.7 \text{ nM} (\text{n}=5, \text{平均}\pm\text{SD})$  および $3.24 \pm 1.6 \text{ nM} (\text{n}=4)$  のKdで被覆されたダイモサン粒子に結合する。(図10参照)。従って、CR2-IgG1

キメラは細胞内CR2 のマウス内の相補活性化複合体の結合に対して競合するため用いることが可能である。

**実施例3 EBV-インフェクションの除去**

EBVは実施例2に従って培養された細胞から精製された。EBVは $12000 \text{ cpsi}$  で90分間遠心することによって沈殿化され、もとの体積の1%に再溶解され、 $0.8 \mu\text{m}$  膜フィルターを通して通過し、100X EBVとした。対数増殖期にある、 $5 \times 10^{-6}$

\* RANOS 細胞 (ATCCアッセイナンバー #1596) は、 $10 \mu\text{l}$  の $100 \text{ X}$  EBV および様々な濃度のCR2-IgG1または実施例1におけるIgG1コントロールを含む $90 \mu\text{l}$  の実施例2の組織培養培地中で培養された。37°Cで二日間培養後、四胞は洗浄され、顕微鏡スライド上に乾燥され、空気乾燥されてメタノールで固定された。それらは、エピクライン-ペール抗原 (EBNA) に対する抗体を含むことが示されている10%のヒト血清と、ヤギ抗体 C3-MTCとともに、37°Cで30分間連続的に保温され、染められた。(Garber (1980), "Herpesvirus," In Lennette, et al., eds., *Manual of Clinical Microbiology* 3rd ed., Am. Soc. Microbiol., Washington, pp. 807-809)。

EBVによるRANOS 細胞のインフェクションはCR2-IgG1の濃度によって、量に依存して阻害された。 $0.4 \mu\text{g/ml}$  の濃度では、EBNA陽性は、バックグラウンドのレベルにまで低下した。コントロールのIgG1は非添加と同様の作用を示した; どちらの場合も $10 \text{ X}$  RANOS 細胞がインフェクトされた。

**実施例4 PBLによるEBV 感染性 C3-チミジンの取り込みの除去**

CR2-IgG1の、PBLsのEBV-感性性増殖に対する阻害能はT-リンパ球の増殖を阻害するシクロスボリン存在下で評価された。EBVウイルスは実施例2の記述に従って8日間増殖させた培養細胞の上清から精製した。細胞は $3500 \text{ cpsi}$  で15分間の遠心によって除去された。上清は $0.4 \mu\text{m}$  の膜フィルターを通して、末梢血白血球 (PBL) のインフェクションに用いられた。既述のパラメータは未梢血からフィコールーパックによって、遠心して単離された。 $5.0 \times 10^4 \text{ RPMI } 1640 + 20 \text{ % FCS}$  中の $10^3 \text{ PBL}$  は、 $50 \mu\text{l}$  のEBV 感染液および様々な濃度のCR2-IgG1または実施例1におけるコントロールのIgG1とともに、37°Cで一晩培養された。T細胞による干渉を防ぐために、シクロスボリン ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) が、RPMI 16

40、 $10\%$  エタノール、 $2\%$  Tween80 に溶解された。 $1\text{g}/\text{ml}$  保存浴液から添加された (Ricklinson, et al., *Cell Immunol.* (1984), vol. 87, pp. 646-658)。48時間後に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  C3<sup>+</sup>-B-チミジンが添加された。12時間後に細胞は葉められ、取り込まれた放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定された。

B-チミジンの取り込みによって観察したEBV インフェクトされたB-リンパ球の副産物は、CR2-IgG1によって量依存的に阻害され、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  で完全に阻害される (図6)。

**実施例5 CR2-IgG1の、抗原に対する一次反応の抑制能力**

抗体依存的な、T-依存またはT-非依存の抗体反応に対する抗体反応のネズミのモデルは確立されている (Natsuda, et al., (1978) *J. Immunol.* 121: 12048および Martinelli, et al., (1978) *J. Immunol.* 121: 2043)。BALB/cマウスはKCl 酸性浴液から得た。それらは、剖殺後1週間休ませた。細胞の活性のために、マウスは $20 \mu\text{g}$  のコプラク因子(CPF) を腹腔内に、免疫化の前に24時間に渡って等量ずつ回盲部注入された。CR2-IgG1およびコントロール (無関係なIgG1) は免疫原である逆性フィコールとともに、免疫化する時点で投与された。このT-非依存的な抗原は、細胞分子につき91分子の蛍光を含んでいる。マウスは少量 ( $8 \mu\text{g}$ ) および多量 ( $100 \mu\text{g}$ ) の逆光・フィコールによって免疫化された。5日目にマウスは致死され、血液サンプルは吸引され、腹腔細胞は、PPC 分析に用いられ、IgM およびブラーク形成細胞 (PFC) 反応が決定された (Dizzi, et al., *J. Immunol.* (1989), vol. 143, pp. 1239-1244)。IgM 値は用いられたELISA-システムにおいて測定された $\text{mO}/\text{ml}$  と比較していた。

免疫化と同時に投与された、 $100 \mu\text{g}$  のCR2-IgG1はIgM レベルを $57 \pm 0.5 \text{ mO}/\text{ml}$  から40に低下させた。CPF は $15 \text{ mO}/\text{ml}$  まで大幅に低下した: 0日に決定されたバッケグラウンドは $55 \text{ mO}/\text{ml}$  であった (図7)。CR2-IgG1で処理したネズミの脾臓におけるPFCsの数もまた約50%低下していた: コントロールのIgG1で処理したマウスは $10^4$  に対して、 $3.5 \times 10^3$  の特異的ブラーク、CPF 処理したマウスは $1000$  CR2-IgG1処理したマウスは $2200$  となった。

CPF はコプラク素から得られたタンパク質で、C3に対するコンペルターゼの活性を持つ。この酵素は注入されたマウスの活性のあるC3を枯渇させ、したがって、

少量の免疫原に対する免疫反応を低下させる。CPF はこれらの実験に於てポジティブコントロールとして用いられている。CR2-IgG1結合タンパク質は產生された特異的IgG のレベルを低下させ、 $8 \mu\text{g}$  の逆光フィコールによって免疫化された後の脾臓当りのPPC の数をCPF と比較して50%まで低下させる。 $100 \mu\text{g}$  逆光フィコールに対する反応はCPF で阻害されるほど脾臓には低下しない (Martinelli, et al., (1978) *J. Immunol.* 121: 2043-2055)。

CR2-IgG1は細胞内CR2 と、C3dにたいして、効果的に結合するが、これはおそらく、抗体-抗原複合体を生じさせ、ここに免疫化の間に結合し、したがって、B細胞に対するCR2 の共に到達する役割を減少させるのである。CR2-IgG1はB細胞の活性化を $\text{in vivo}$  で抑えることが出来たため、扱いにくい抗原特異的B細胞活性化を含む疾状においても臨床的に有用であろう。

CR2-IgG1構築物の、T-依存的抗原、ヒツジ赤血球に対するマウスの反応における効果もまた、測定された。3つのグループのBALB/cマウスはヒツジ赤血球に対する免疫反応を評価された (1) : 最初のグループのマウスは全量 $800 \mu\text{g}$  となる粗挽えIgG1を4回に分けて、免疫化0時間に脾臓内に。そして、免疫化0.5時間、3時間、および17時間後に脾臓内にそれぞれ、 $4 \times 10^4$  および $4 \times 10^5$  Iuえられた: 2番目のグループのマウスにはIgG1の代わりにCR2-IgG1が投与された; そして、3番目のグループのマウスは免疫化に先立つ24時間の間にコプラク因子処理によってC3を枯渇させられた。4番目のグループのマウスにはPBSのみが与えられ、ヒツジによる免疫化はされなかった。

CR2-IgG1およびIgG1の注入の方法はCR2-IgG1の最初の半波期を記述する基本的な代謝の研究の後に明示された。免疫化の後、5日にマウスはヒツジに特異的な脾臓直接的ブラーク形成細胞 (PFC) の数と、抗-E IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b およびIgG3の血清レベルを評価された。粗挽えIgG1を与えられたコントロールのマウスはヒツジに對して、質に比例して反応し、脾臓PPC の数と、IgG1を除いた計測した全てのアイソタイプのなかで特異的抗体の血清濃度が増加した (図11)。

既に報告されているように、特異的抗体反応はマウスC3の枯渇によって消滅するが、このことは、この実験で用いられている抗原の濃度では、B細胞の反応は

### 特表平5-507197 (10)

この補体タンパク質の活性化に依存していることを示唆している。CR2-IgG1を含んだマウスはC3-消失マウスと同様に免疫抑制されており、このことは、田淵内のCR2はこのT細胞依存的T細胞反応の補体依存性を説明していること、そして、CR2-IgG1はT-依存的抗原に対する抗体反応の効率的な抑制剤であることを意味している。

#### CR2-IgG1構造物のアソシティブスイッチの阻害能

さらに、CR2-IgG1キメラの、IgG以外のアソシティブのうちで抗-E抗体の発現に対する効果を検討するために、マウスは $4 \times 10^6$  I.U.の免疫化後3から5週間に渡って評価された。二つのグループのBALB/cマウスは、全量800 μgとなるIgG1およびCR2-IgG1をそれぞれ、等量となるように5回に分けて、免疫前1時間に腹腔内に、免疫化と同時に静脈内に、そして、免疫化0.5時間、3時間、および17時間後に腹腔内に投与された；3番目のグループはPBSを投与され、ECによる免疫化は受けなかった。CR2-IgG1は抗E-IgGを5日に完全に抑制し、それ以後はこの特異性を有するIgGはいかなるグループにおいても検出できなかった（図12）。後期に最高値を持ち、IgG処理されたマウスでは40%にわたって持続する、様々なIgGアソシティブの中で、抗-Eの出現もまた、CR2-IgG1で処理されたマウスでは50%から70%消失していた。従って、可溶性CR2は、一次反応およびそれに続く、T-依存性抗原、ヒツジへのアソシティブスイッチングを阻害する。この実験は、組換えタンパク質中に混入している可能性のあるリボボリサッカライド（LPS）の影響を除くためにLPS耐性である、C3H/HeJ株でもおこなわれたが、0.16ng/μgタンパク質以上の濃度において行なわれた。Liu et al. 上清分析において、何も検出されなかった。CR2-IgG1は、BALB/cマウスの場合と同様、C3H/HeJマウスにおいて、ヒツジに対するIgGおよびIgM反応を抑制する動きを見せた（図11）。このことはCR2-IgG1分子が、抗原に対する1次B細胞応答を阻害する。*In vivo*における効率的な免疫抑制剤であることを示している。

#### 実験例5 阻害されたCR2構造物の半減期の測定

組換えIgG1、CR2-IgG1およびCR2-F(ab')2は<sup>35</sup>Iで標識され、マウスに注入された。様々な時間に血液は採取され、放射活性が測定された。標識された構造物の濃度は既知の特異的放射活性を用いて計算された。得られた結果は図13に示す。

されている。検査は各種に対して、2相的であった。CR2-IgG1の半減期は最初は60よりも短かったが、10から20時間にかけてはそれらの半減期は類似していた。CR2-F(ab')2はIgGまたはCR2-IgG1の両方の場合よりも明らかにより早く消失した。従って、CR2のSCRsのIgGの各重鎖への結合はイムノグロブリンの上位における特徴的な安定性の大部分を維持している分子を産生していることになる。

#### 実験例7 CR2-F(ab')2構造物は抗体結合を阻害する

CR1は30のSCRs（短い交替繰り返し配列）をP-アソシティブ中に含んでいる。SCRsは最初の20のうち、7つのSCRsの4グループとなるよう並べられている。これらのグループのうちのひとつ（長い相同繰り返し構造）はC3bの結合サイトをもち、ふたつはC3dに対する結合サイトを持っている。B-11と番号が付いたSCRs（C3d結合活性があると予想されている）は本発明に従った。組換えDNA技術によってイムノグロブリン重鎖F(ab')2に付着している。CR1のSCRs-B-11に対応する配列は末端のPstI認識配列を含む特異的プライマーを用いて、CR1の全长DNAクローンの重合選択反応地図によって産生された。（27マーの5'プライマー配列は5'-CTGCCACCTGGGTCACATGTCAGCC3'；42マーの3'プライマー配列は5'-GACCCGAGCTGGGACCTGGCTCACCTC-）増幅されたDNAはPstIで切断され、得られたCR1断片はP(ab')2ベクター（Kerbrey et al., 1994, Nature 312:604-608）のPstIサイトにクローニングされた。ハイブリッドのCR1-F(ab')2は、組換えプラスミドをJ558細胞にトランフェクトし、得られた細胞を RPMI培地にC3bと10%仔ウシ血清を加えた培地内で培養することによって、タンパク質として発見される。タンパク質の発現はNIP 抗腹膜ELISA分析によって決定される。発現されたCR1-F(ab')2はNIP-セファロースアフィニティーカロマトグラフィーによって精製され、PBS中で透析され、-100°Cで保存される。得られたタンパク質は、ヒト赤血球に対するC3bの結合に対する阻害能に関して評価される。比較するために、可溶性CR1（sCR1）を用いて同様の阻害実験が行なわれた。

C3b 2量体は<sup>125</sup>Iによって放射性標識され、ヒト赤血球とともに培養される。様々な量のsCR1/pBSCR1cまたはF(ab')2-sCR1が添加され、赤血球に結合した。<sup>125</sup>I-C3bの量が決定される。図14に示したように、sCR1/pBSCR1cおよび

F(ab')2構造物の結合を同様に阻害する。このことは、SCRs-B-11はCR1の完全なC3b結合能を含んでいることを示している。従って、30 SCRをもつsCR1/pBSCR1cの完全な2倍のC3b結合能は、これらSCRsのたった4つを、各F(ab')2構造物の量で付加するだけで、達成可能である。

#### 実験例8 CR1-F(ab')2構造物は古典的補体の経路を阻害しない

抗体依存性ヒツジ赤血球（E）はヒト補体の古典的経路の活性化によって溶解される。ヒトCR1の可溶性断片は、結合し、ヒト補体のC4bおよびC3bを不活性化する事によって、この溶解を阻害する。sCR1/pBSCR1cおよびF(ab')2-sCR1が、この溶解を阻害する能力を解析された。図15に示したように、sCR1/pBSCR1cは、この溶解をほとんど完全に阻害する。F(ab')2-sCR1（SCRs-B-11のみを含む）は、かなり弱い程度で阻害する。おそらく、これは、構造物中にC3b結合サイトが欠落しているためであろうと考えられる。C3b結合能およびC3b不活性化能はCR1-F(ab')2に与えるようなSCRsの付加によって、同様な古典的経路阻害能が供与されることが期待される。

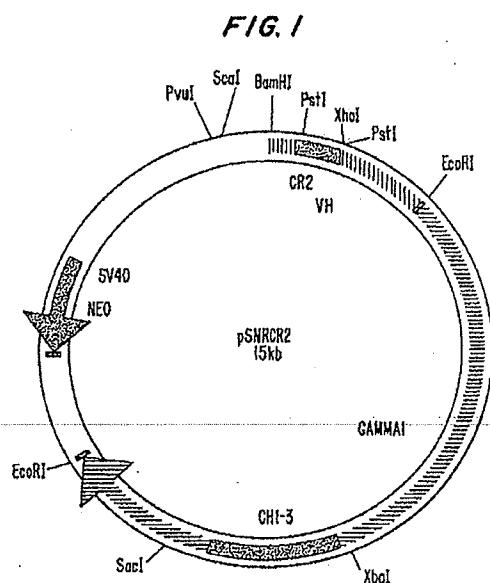
#### 実験例9 CR1-F(ab')2構造物は補体の代償経路を阻害する

ダイモサンは補体の補充経路の阻害物であるが、ヒト血清中の代替経路を活性化する。活性化は、C3aまたはC5aに対する放射免疫分析（RIA）によって測定することができる。sCR1/pBSCR1cはこの活性化を阻害することが知られている。

F(ab')2-sCR1構造物による、ダイモサンによる代替経路の活性化の阻害は、測定され、sCR1/pBSCR1cの場合と比較された。図16及び17に示したように、F(ab')2-sCR1はsCR1/pBSCR1cと同様にC3aの形成を阻害し、sCR1/pBSCR1cとはほとんど同じくC5aを阻害する。

これらの結果は、SCRs-pBSCR1の代替経路阻害能の全てはSCRs-B-11のみをF(ab')2構造物中の各重鎖に転移することによって再現されることを示唆している。

これらの研究は、また、これらのSCRsが代替経路阻害者の全機能に充分であっても、C3b結合能およびC3b不活性化能を有するCR1の最初の長い相同繰り返し配列のSCRsの付加は、古典的経路阻害能に必要であることを示唆している。



特表平5-507197 (11)

添付(内容に変更なし)

FIG. 2A

AAATCCCTGTTCTACAGTGTAAATAATAGGGTTGCTACAGATACAAAAACATGAG  
90 100 110 120 130 140  
ATCACCTTCCTTACAGTACTGACACAGGACCTACCCATGGGAAGGCTGTAT  
150 160 170 180 190 200  
CATGCCTCTCTGGCAGAACAGCTACAGGTAAAGGGCTCACAGTAGCAAGGCTTGAGGTC  
M L F L A A T A T  
ペプチド ..... -5  
210 220 230 240 250 260  
TG GACATATCATGGGTACAATGACATCCACITTCCTTCACAGGTTCAC  
270 280 290 300 310 320  
-4

添付(内容に変更なし)

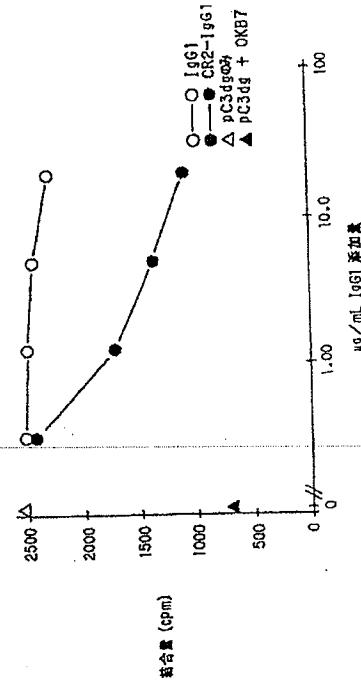
FIG. 2B

CCAGGTCCAACCTGGGCTGGGATTTCTGT  
S Q V Q L Q L G I S C ..  
< — 196 CR2 —————>  
330  
CR201b400スクレオチド数  
.....

添付(内容に変更なし)

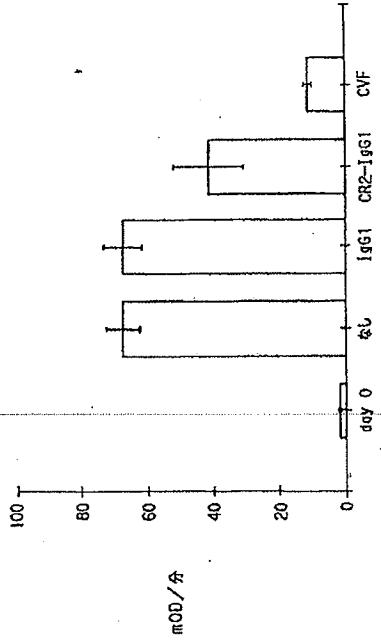
FIG. 4

3X0EG K562-CR2 + 1μg/ml pCDg



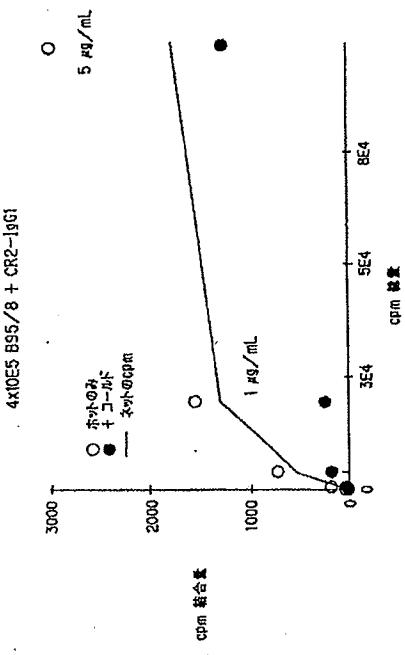
淨世(内容に變更なし)

FIG. 7



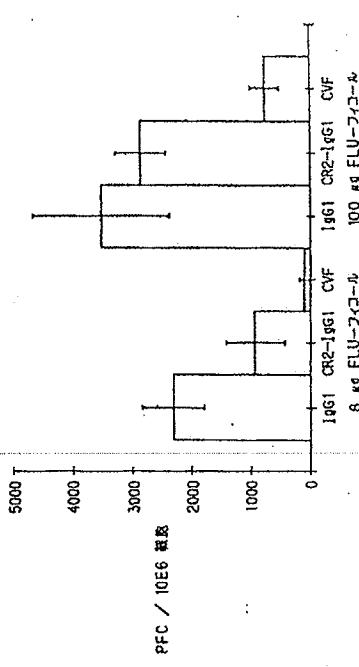
静齊(内容に変更なし)

۱۶۵



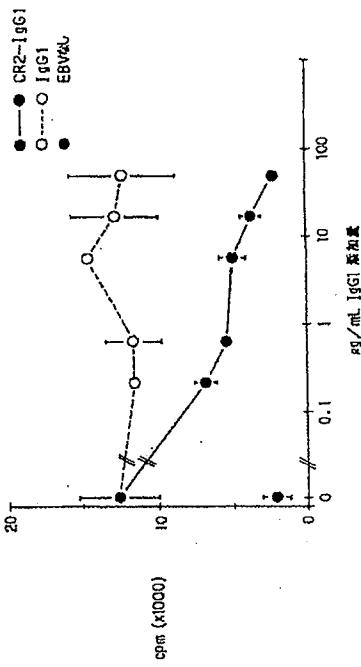
卷之三

FIG. 8



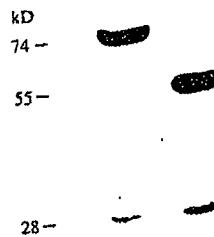
卷之三

三

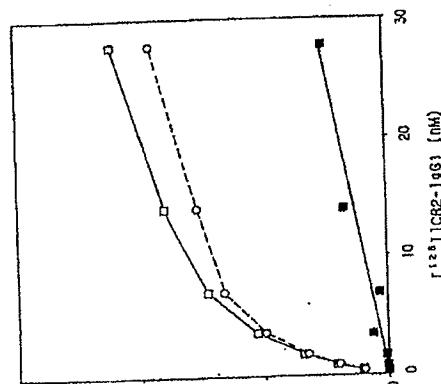


特表平5-507137 (12)

FIG. 9



溶離(内容に変更なし)  
FIG. 10B



溶離(内容に変更なし)  
FIG. 10A

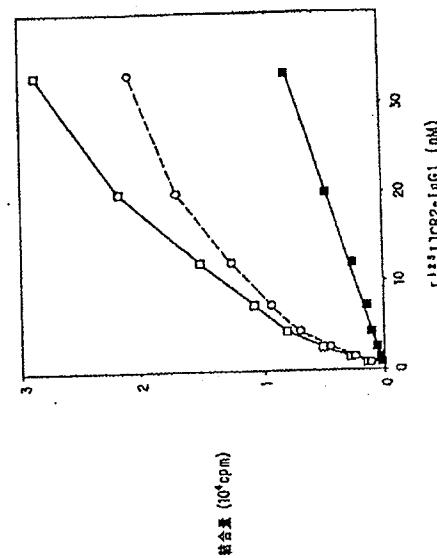


FIG. 11A

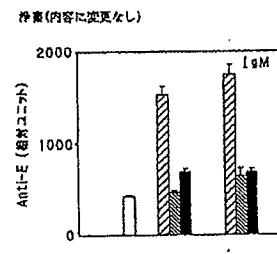


FIG. 11B

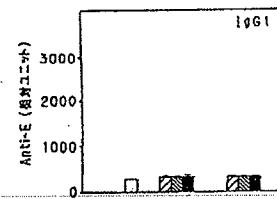
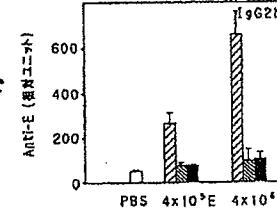
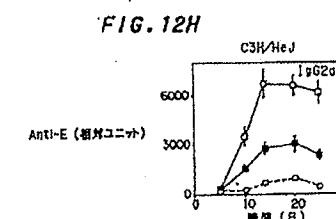
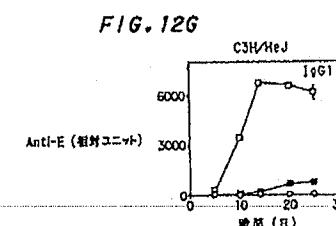
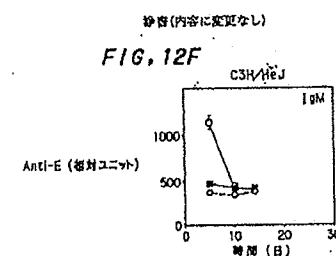
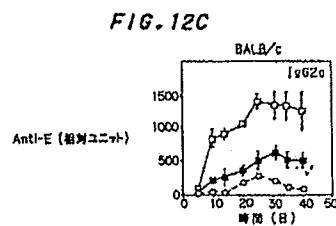
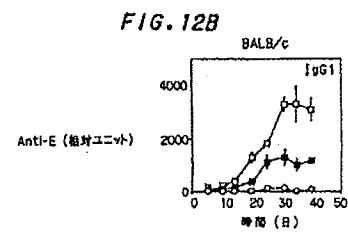
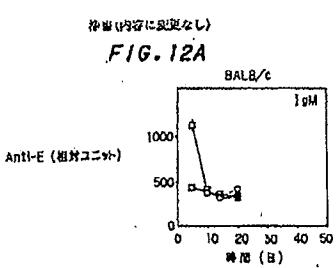
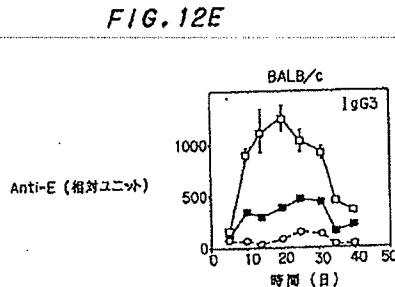
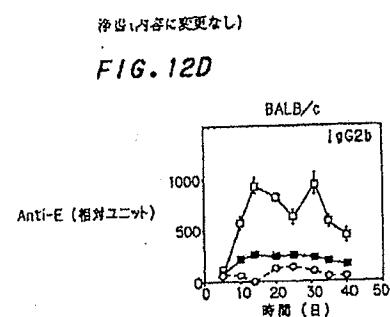
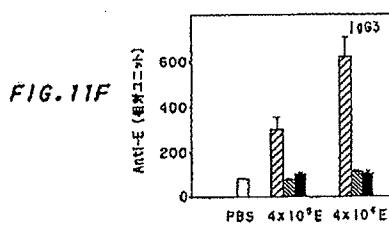
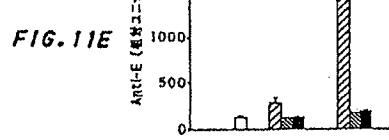
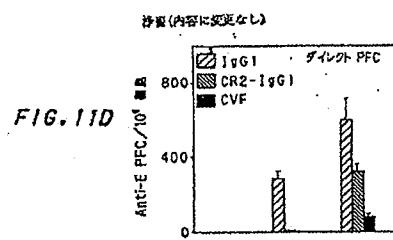


FIG. 11C





添付(内容に変更なし)

FIG. 12I

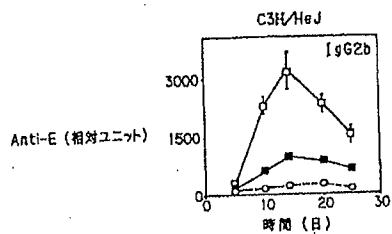
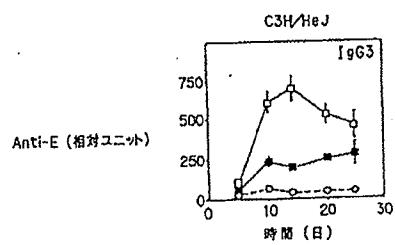
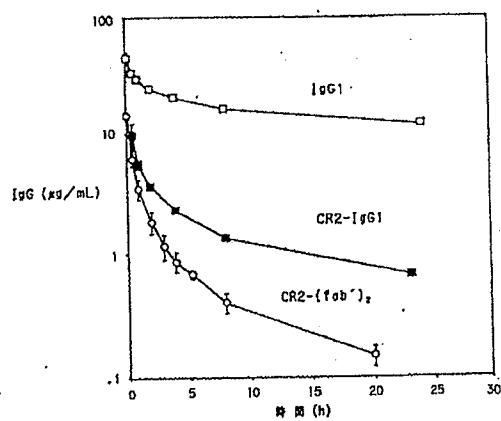


FIG. 12J



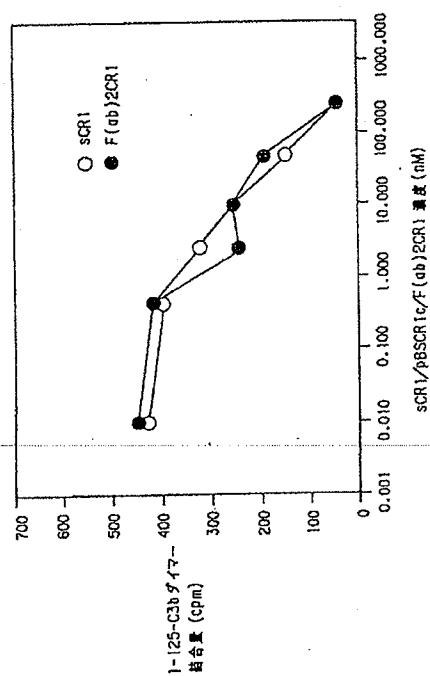
添付(内容に変更なし)

FIG. 13



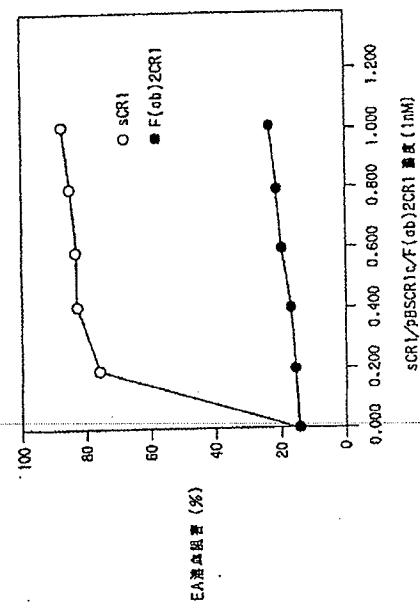
添付(内容に変更なし)

FIG. 14



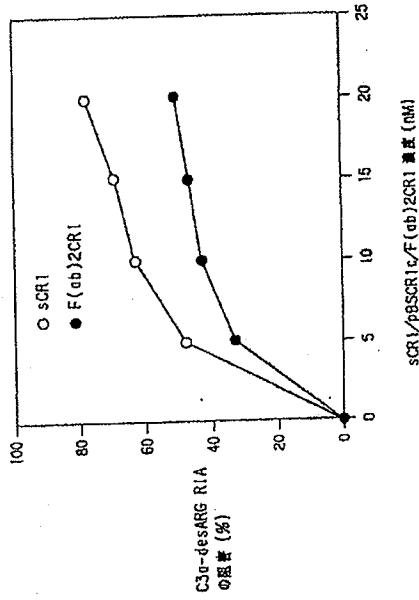
添付(内容に変更なし)

FIG. 15



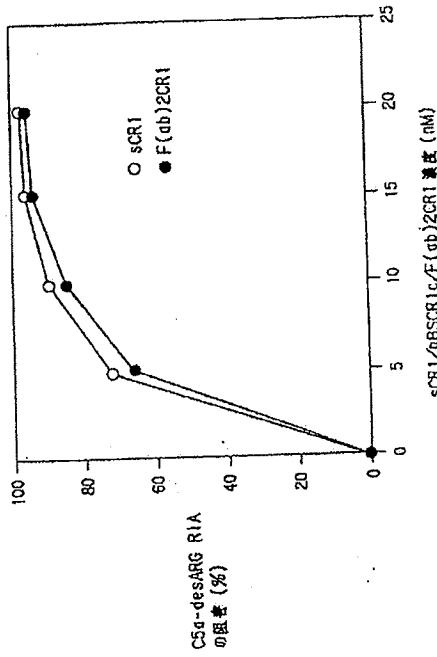
静叢(内容に變更なし)

E/G. 16



浮書(内容に変更なし)

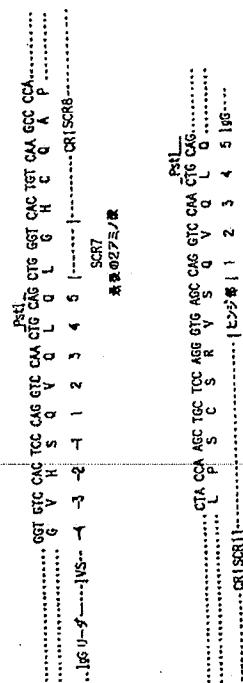
FIG. 17



SCB1/SBSCB1EF(gb)2CR1遺傳(ηM)

卷之三

١٨



五

本発明は、哺乳動物の免疫系において死正で、抗体受容体部位などの極性分子に対する認識部位を含み免疫グロブリン類のN末端に繋がれたポリペプチドを含む、可溶性組み換え融合タンパク質を目指すものである。本発明は、生理学的に適合可能な可溶性巨大分子担体に付けられた、抗体結合部位を持つ短い共通性あり返し配列を含む複数のペプチドを含む複数物を目指している。本発明は、哺乳動物において抗体活性化または抗体依存性細胞活性化を阻止するために特に有用である。

## 特表平5-507187 (17)

手続補正書

平成 5年 6月 4日

特許庁長官 麻生 渡殿

## 1. 事件の表示

PCT/US91/02852  
平成3年特許第509396号2. 発明の名称  
結合部位を含む可溶性ペプチド類縁体

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所  
名 称 ザ・ジョーンズ・ホブキンス・ユニバーシティ

## 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206区  
電話 3270-6641~6  
氏名 (2770) 弁理士 渡 殿

## 5. 補正の対象

(1) 出願人の代表者名を記載した国内書面  
 (2) 委任状及び翻訳文  
 (3) 国面翻訳文

## 6. 補正の内容

別紙の通り (尚、上記(3)の書面の内容には変更なし)



II. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (10 most important symbols used, including class, subclass and CPC)		PCT/US 91/02852
Assigned by International Patent Classification or by other Classification and CPC		
Int'l Cl. 42 H 16/02 C 07 K 13/00 C 12 P 21/02		
A 61 K 37/02 A 61 X 39/395 C 12 N 5/10		
III. FIELDS SEARCHED		
X (Indicates Descriptions Searched)		
Classification System	Classification System	
Int.Cl.-S	C 32 N	C 07 K
Descriptive Abstracts and/or References (not limited to the Fields Searched)		
to the Essential Part of the Document as Filed or as the Field Searched		
IV. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category * Character of Document, <sup>11</sup> e.g. technical, legal, commercial, or administrative document		Reference to Order No. <sup>12</sup>
Y	EP-A-0125262 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 26 July 1989, see the whole document "..."	1-3
Y	WO-A-8909220 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 6 October 1989, see page 25, lines 13-14; page 26, lines 27-31; lines 1-14; page 35, lines 10-12; page 47, lines 23-37; pages 48-61; claims 32, lines 1-14; claims "..."	1-3
Y	NATURE, volume 339, 1 June 1989, V.K. Chucheria et al.; "A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to pseudomonas exotoxin", pages 394-397; see the whole document "..."	1-3
<small><sup>10</sup> If prior art appears in cited documents 1-10  <sup>11</sup> A document containing the claimed subject matter is not relevant if it does not relate to the claimed invention or if it is not available to us  <sup>12</sup> A document previously or after the international filing date, which has been cited as prior art in the International Search Report or in the International Preliminary Examination Report  <sup>13</sup> An amendment which may either extend the priority claim or add new subject matter to the application  <sup>14</sup> An amendment relating to an oral amendment, can, nevertheless, be considered as filed in accordance with the rules of procedure of the International Bureau if it is filed before the International Bureau receives the oral amendment  <sup>15</sup> Document referred to in the International Search Report and/or the International Preliminary Examination Report  <sup>16</sup> Number of the cited prior art document  <sup>17</sup> Number of the cited prior art document</small>		
V. CERTIFICATION		
Date of the latest Conference of the International Bureau	Date of mailing of this International Search Report	
22-08-1991	08 XI 91	
International Searching Authority	Examiner-in-Charge or Other	
EUROPEAN PATENT OFFICE	<i>L. Tocino</i> <i>Giulio TORRIO</i>	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		International Application No. PCT/US 91/02852
Character of Document, who informed, where reproduced, of the relevant passage		Reference to Claim No.
Category		
Y	The Journal of Immunology, volume 135, no. 4, October 1985, The American Association of Immunologists (US) L.F. Fries et al.; "Factor I co-factor activity of CR1 overcomes the protective effect of IgG on complement-bound C3b residues", pages 2073-2079, see the whole document "..."	1-3
X	WO-A-9004176 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, USA) 19 April 1990, see page 9, lines 13-35; pages 10-16; page 17, lines 1-2	1-3
A	Trends in Biotechnology, volume 6, no. 2, February 1988, Elsevier Publications (Cambridge, GB) G. Williams; "Novel antibody reagents: production and potential", pages 36-42, see page 38, column 2, last paragraph; page 39, paragraphs 1-3; figure 1	1-19, 21
P, X	The Facet Journal, volume 4, no. 7, 26 April 1990, T. Hebeil et al.; "CR2 IgC chimeras: A dimeric soluble receptor that binds C3dg and EBV and inhibits the immune response to T-independent antigens", page A1082, abstract 1102, see the abstract "..."	

VI. FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		International Application No. PCT/US 91/02852
<p><b>V.1 OBSERVATION WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSearchable.<sup>18</sup></b></p> <p>If the International Search Report has been transmitted in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Closed priority.</b> <i>10-21-91</i> <i>Indicates they are not further examined by the International Bureau.</i></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Unknown, incomplete, contradictory, or inconsistent.</b> <i>see PCT-Rule 39.3(c)(iv)</i></p> <p><input type="checkbox"/> <b>Open numbers.</b> <i>Indicates they are not part of the International application that do not comply with the priorities mentioned in such an extent that an acceptable International search can be carried out, necessarily.</i></p> <p><input type="checkbox"/> <b>Claim numbers.</b> <i>Indicates they are dependent of other and are not examined in accordance with the priority and date mentioned in PCT Rule 6(2).</i></p> <p><b>V.2 OBSERVATION WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING.<sup>19</sup></b></p> <p>If the International Searching Authority found certain inventions in the International application as follows:</p> <p><input type="checkbox"/> <b>1. If all reported additional inventors have been clearly paid by the applicant, the International Search Report should be accompanied by:</b> <i>the International application.</i></p> <p><input type="checkbox"/> <b>2. If any one of the reported additional inventors has been clearly paid by the applicant, the International Search Report should also include a copy of the International application for which this inventor has paid, necessarily.</b></p> <p><input type="checkbox"/> <b>3. If all reported additional inventors have been clearly paid by the applicant, Correspondingly, the International Search Report should be accompanied by:</b> <i>the International application in its entirety, or a copy of it.</i></p> <p><input type="checkbox"/> <b>4. If all inventors clearly stated in the application, or a copy of it, have clearly paid by the applicant:</b> <i>the International application.</i></p> <p><input type="checkbox"/> <b>5. If the additional inventors have been clearly paid by the applicant:</b> <i>the International application.</i></p> <p><input type="checkbox"/> <b>6. If the additional inventors have been clearly paid by the applicant:</b> <i>the International application.</i></p>		

International Application No. PCT/US 91/02852

## 国際調査報告

US 3102852  
SA 47632

This Inquiry Date is the earliest Inquiry date relating to the present statement(s) cited in the above-mentioned International Search Report.  
The Examiner or his supervisor in the European Patent Office (EPO) has 17/07/91.  
The European Patent Office is in no way liable for those particular vehicles not clearly given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publishing date	Patent family number(s)	Publishing date
EP-A- 0325262	26-07-89	AU-A- 3281869 JP-T- 3502283 WO-A- 8906590	11-08-89 30-05-91 27-07-89
WO-A- 8909220	05-10-89	AU-A- 3539189 EP-A- 0411031	16-10-89 05-02-91
WO-A- 9004176	19-04-90	AU-A- 6341389 EP-A- 0436626	01-05-90 17-07-91

For more details about this search, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/83.

## 第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5	識別記号	序内整理番号
A 61 K 37/02 39/395	AB J Y AAA Y ABA Y ABE Y ACB Y	8314-4C 9284-4C 9284-4C 9284-4C 9284-4C
C 07 K 15/12 C 12 N 5/10 15/62 15/85		7731-4H
// C 12 N 15/13 C 12 P 21/08 (C 12 P 21/02 C 12 R 1:91)		8214-4B

⑥発明者 ヘベル, トーマス

ドイツ連邦共和国デー-2000, ハンブルグ 65, エメクスヴエーグ